

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Ciencias
Departamento de Biología

Regulación del ciclo celular
durante el proceso infectivo
de *Ustilago maydis*

Tesis Doctoral

Natalia Mielnichuk

Madrid, 2007

Memoria presentada por Natalia Mielnichuk para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. José Pérez-Martín.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Pepe por todos estos años de experimentos, experiencias y aprendizajes. Por acercarme a la biología molecular y enseñarme la vida científica.

Nacho y Nati, por formar parte de mi historia con Ustilago. Por las discusiones, los consejos, las manos y por ser mis amigos. Para mí, el mejor lado oscuro.

Al grupo BiMi de la caña de los jueves. Donde surgieron experimentos, ideas y amigos.

A toda la gente del laboratorio con quienes compartimos esta intriga por el sexo y la polaridad de Ustilago.

Mari y Lara, que aunque no estén acá, forman parte de todas las cosas que hago. A Alejo, por animarnos a empezar esta historia juntos y por animarnos a seguirla separados. A Mana y a Vale por escuchar las historias con los bichitos y acompañarme todo este tiempo.

A mi familia, mi papá, mi mamá y mi hermana, por animarme siempre y confiar en mí en este periplo científico. Y a Pako, porque de tu mano todo es más fácil.

ÍNDICE

RESUMEN EN INGLÉS	1
ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	5
1. El problema y el modelo de estudio	7
2. El ciclo de vida de <i>Ustilago maydis</i>	8
3. Primer reconocimiento, comienza el proceso infeccioso	9
4. Segundo reconocimiento, establecimiento del dicarionte	10
5. Regulación del ciclo celular	13
6. El ciclo celular en <i>U. maydis</i>	14
7. Regulación de la transición G2/M	18
8. Ciclo celular y patogénesis en <i>U. maydis</i>	25
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Estirpes y plásmidos	33
2. Medios y condiciones de cultivo	36
3. Metodologías genéticas	38
4. Metodologías para el tratamiento de ARN	39
5. Metodologías para el tratamiento de proteínas	41
6. Análisis de citometría de flujo (FACS)	43
7. Microscopía	43
8. Infección de plantas <i>Zea mays</i>	44
9. Germinación de teliosporas	45
10. Daño al ADN por tratamiento con luz UV	45
11. Análisis <i>in silico</i> de las secuencias	45

12. Construcción de las distintas estirpes de <i>U. maydis</i>	46
RESULTADOS	59
CAPÍTULO I	
LA PARADA DEL CICLO CELULAR EN EL FILAMENTO INFECTIVO	61
1. La parada de ciclo	63
2. Bmh1, un regulador negativo de Cdc25	72
3. Srk1, Chk1 y Par1, las posibles quinasas de Cdc25	74
4. Otros reguladores del paso G2/M, Plk1 y Hsl1	76
5. Dos paradas en G2	78
6. Mantenimiento de la parada de ciclo sobre la planta	82
CAPÍTULO II	
REGULADORES DE LA TRANSICIÓN G2/M	87
1. Análisis de la proteína Bmh1	89
2. Análisis de las proteínas Chk1 y Srk1	98
3. Análisis de la proteína Plk1	102
4. Análisis de la proteína Hsl1	115
DISCUSIÓN	119
CONCLUSIONES	131
BIBLIOGRAFÍA	135
ANEXO	151
Anexo 1	153
Anexo 2	157

RESUMEN EN INGLÉS

Infective process often involves morphogenetic changes and the reset of the cell cycle in the pathogen in order to activate the virulence program. To study the relation between these processes we use the dimorphic fungi *Ustilago maydis*, the causative agent of smut disease on corn. The life cycle of this phytopathogen has a saprophytic and a biotrophic phase. The transition between these two phases involves the transition between a yeast-like form in which cells divide by budding, to a filamentous form. After mating of two compatible haploid cells, a new structure called infective filament is formed. This filament that carries the two undivided nuclei from the compatible cells, explores the plant surface and then, after forming an appresoria, penetrates the plant tissue. The filament formation and pathogenic development are controlled by the bW/bE transcription factor, a master virulence regulator. *Ustilago maydis* undergoes a cell cycle arrest at G2 phase in response to mating process. This cell cycle arrest is maintained after cell fusion by an unknown mechanism supposedly regulated by the bW/bE transcription factor.

In this work we have studied the cell cycle regulation during the infective filament formation and characterized three G2/M regulators: Bmh1, Plk1 and Hsl1. We have demonstrated that activation of the bW/bE transcription factor caused a G2 cell cycle arrest. However, the transcriptional regulation of the main G2/M regulators (Cdk1 and cyclins B) was not determinant for the cell cycle arrest. On the other hand, cells carrying a Cdk1 version refractory to inhibitory phosphorylation could not maintain the cell cycle arrest, resulting in filament harbouring more than one nucleus. In this process, regulation of the Cdc25 phosphatase by the 14-3-3 protein is crucial for the establishment of cell cycle arrest. Additional players were Plk1, an essential protein for G2/M transition in *U. maydis*, and Clb1 that could be involved in the maintenance of the cell cycle arrest. Finally, Hsl1 might act integrating cell cycle signals with morphogenesis. These results suggest a complex mechanism involved in the regulation of the cell cycle arrest during the formation of the infective filament.

ABREVIATURAS

Å: amperio

aa: aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AMP c: Adenosil 3', 5' - monofosfato cíclico

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: Ribonucleasa

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNr: Ácido ribonucleico ribosomal

C: contenido de ADN

Cbx: carboxina

CF: calcoflúor

DAPI: 4', 6' - diamidino2- fenilindol

dCTP: 2'-desocitidina-5'-trifosfato

DMSO: dimetil- sulfóxido

dNTP: desoxirribonucleótido

DO: densidad óptica

EDTA: ácido etilendiaminotetracético

FACS: Análisis de citometría de flujo

Fig.: figura

GFP: proteína fluoresecente verde

h: hora

Hyg: higromicina

J: Julio

kb: kilobase

kDa: kilodalton

MOPS: Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfónico

Nat: nourseotricina

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

RFP: proteína fluorescente verde

SDS: dodecil sulfato sódico

UV: ultravioleta

WGA-FITC: Aglutina del germen de trigo asociada a flourocromo

Introducción

1. El problema y el modelo de estudio

El ciclo de vida de muchos hongos patógenos está caracterizado por la presencia de dos fases, una saprófita y una biótropa. A menudo, la transición entre estas dos fases requiere el cambio en la forma de crecimiento, de una forma de levadura a una forma filamentosa patógena que permite invadir el tejido vegetal o animal (Gow *et al.*, 2002).

Este cambio morfológico implica un verdadero programa de desarrollo que debe integrar señales ambientales así como señales entre los organismos involucrados (Sánchez-Martínez y Pérez-Martín, 2001). Por otra parte, los cambios en las formas de crecimiento implican una coordinación con el ciclo celular. En un hongo patógeno dimórfico, los mecanismos de control de ciclo celular pueden convertirse en elementos esenciales para una infección exitosa y por lo tanto, los genes implicados en estos mecanismos podrían llegar a considerarse factores de virulencia (Pérez-Martín *et al.*, 2006).

Ustilago maydis es un hongo dimórfico agente responsable de la enfermedad conocida como carbón del maíz (Agrios, 1988). En los últimos años, este fitopatógeno se ha convertido en un excelente modelo para estudiar la relación entre la regulación del ciclo celular, el cambio de la forma de crecimiento y la virulencia; su manejo en el laboratorio es muy sencillo y existen un gran número de técnicas moleculares desarrolladas para su estudio (Bölker, 2001; Martínez-Espinoza *et al.*, 2002; Kahmann y Kämper, 2004). En este organismo, la transición entre la forma de crecimiento como levadura fuera de la planta y la forma filamentosa patógena dentro del tejido vegetal implica también el apareamiento entre dos células (Banuett, 1995), por lo que el cambio de la forma de crecimiento es un proceso complejo que involucra señales entre células de *U. maydis* y señales de la planta. El control del ciclo celular parece jugar un papel importante en este proceso, puesto que se ha observado que el ciclo se detiene desde el reconocimiento de las células y no se reactiva hasta después de producirse la penetración del tejido vegetal (Snetselaar y Mims, 1992; García-Muse *et al.*, 2003).

Por estas razones, consideramos que el estudio del control del ciclo celular nos

permitirá comprender mejor el proceso de infección, tanto de *U. maydis* como de otros patógenos puesto que la maquinaria molecular suele estar conservada entre distintos organismos eucariotas. Finalmente un mejor conocimiento del proceso de infección podría dar lugar al diseño de estrategias de control efectivas.

2. El ciclo de vida de *Ustilago maydis*

Ustilago maydis pertenece al Phylum Basidiomycota, Orden Ustilaginales. En este hongo dimórfico, la transición de la fase saprófita a la patógena está determinada por los alelos de tipo sexual *a* y *b* (Banuett, 1995; Casselton y Olesnick, 1998). Cuando dos células haploides se encuentran sobre la superficie de la planta son capaces de reconocerse mediante un sistema feromona-receptor codificado por el *locus a*. Si ocurre este reconocimiento, es decir, si las células son compatibles para el *locus a*, cada una forma un tubo de conjugación que crece a favor del gradiente de feromona (Spellig *et al.*, 1994; Snetselaar *et al.*, 1996). Cuando los filamentos se encuentran se produce la plasmogamia, pero no la cariogamia, y se forma una estructura dicarionte que recibe el nombre de filamento infectivo (Snetselaar y Mims, 1992). La formación de este filamento así como todos los eventos que ocurren a partir de este momento dependen de la expresión de los genes del *locus b* y de que las células sean también compatibles para este *locus* (Bölker *et al.*, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2004). El filamento infectivo, que posee dos únicos núcleos que no se dividen, es la estructura que explora la superficie de la planta hasta encontrar un lugar apropiado para la penetración del tejido vegetal. Una vez dentro del tejido vegetal se produce el desarrollo de un micelio dicarionte. A los pocos días de la infección se pueden observar los síntomas clásicos de la enfermedad: clorosis, manchas de antocianina y finalmente la aparición de tumores (Agrios, 1988). En los tumores, los filamentos se fragmentan en células individuales donde ocurre la cariogamia (Banuett y Herskowitz, 1996). Estas células diploides, las teliosporas, se cubren de una gruesa pared que por su color negro da el nombre de carbón del maíz a esta enfermedad. Finalmente

en las teliosporas ocurre la meiosis y la germinación de cuatro células haploides que crecen como levaduras completando el ciclo de vida (Fig. 1).

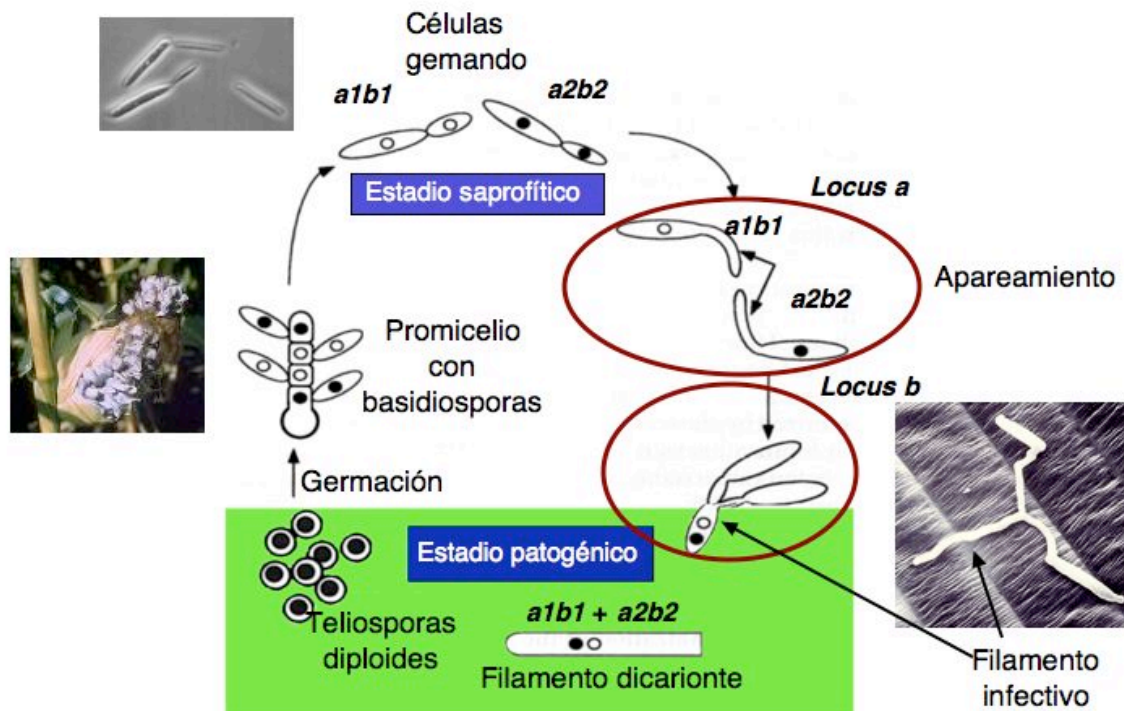


Figura 1. Ciclo de vida de *Ustilago maydis*. Se indican la fase saprófita y la fase patogénica, así como algunos de los procesos mediados por los *loci* a y b. Las células esquematizadas son compatibles para dichos *loci*: célula *a1b2* y célula *a2b2*. Figura adaptada de Snetselaar y Mims (1993); Casselton y Olesnicky (1998)

3. Primer reconocimiento, comienza el proceso infectivo

El reconocimiento entre las células haploides se inicia por una señal que es integrada por las rutas AMPc/MAPK. En el caso de compañeros compatibles, esta señal resulta en la activación de un sistema feromona–receptor codificado por los genes del *locus a* (Krüger *et al.*, 1998, Müller *et al.*, 1999; Müller *et al.*, 2003; Kaffarnik *et al.*, 2003) (Fig. 2). La activación de este sistema produce una parada de ciclo celular en G2 (García-Muse *et al.*, 2003) y como se mencionó anteriormente, la formación del tubo de conjugación que crece a favor del gradiente de feromona y la fusión celular (Spellig *et al.*, 1994; Snetselaar *et al.*,

1996). Finalmente el reconocimiento entre las células provoca la activación de los genes del *locus b* (Kaffarnik *et al.*, 2003).

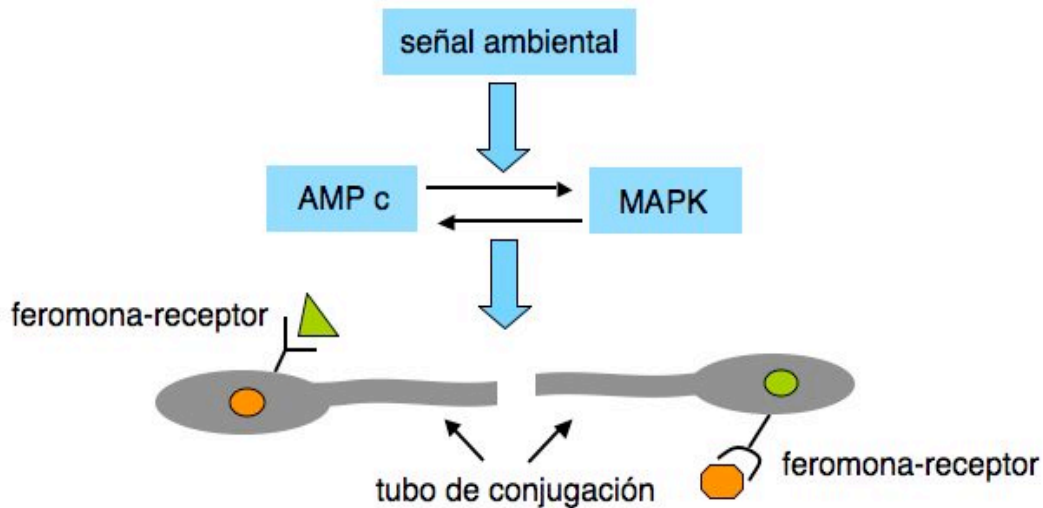


Figura 2. Comienza el reconocimiento y el proceso patológico. Las rutas AMPc y MAPK integran señales del ambiente que activan el sistema feromona-receptor codificado por el *locus a* en el caso de encontrarse dos células compatibles. En verde se indica el núcleo y la feromona de un tipo sexual y en naranja se indica el núcleo y la feromona del tipo sexual compatible

4. Segundo reconocimiento, establecimiento del dicarionte

El *locus* multialélico *b* es un segundo sistema de reconocimiento que entra en juego una vez que se ha producido la plasmogamia. El *locus b* posee dos genes que codifican para dos proteínas con homeodominios denominadas *bE* y *bW*. Estas proteínas dimerizan formando el factor de transcripción *b* cuando provienen de distintos alelos, es decir, de núcleos distintos (Kronstad y Leong, 1989; Gillisen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995) (Fig. 3). Este factor de transcripción controla la expresión de los genes implicados en el crecimiento filamentoso y la patogénesis siendo imprescindible para el desarrollo patológico (Bölker *et al.*, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que existen al menos 20 alelos *b* diferentes en la naturaleza (Klosterman *et al.*, 2007). Cada alelo consiste en el par de genes *bE/bW* que se

transcriben en forma divergente y codifican para proteínas de 473 y 644 aminoácidos respectivamente (Schulz *et al.*, 1990; Gillisen *et al.*, 1992).

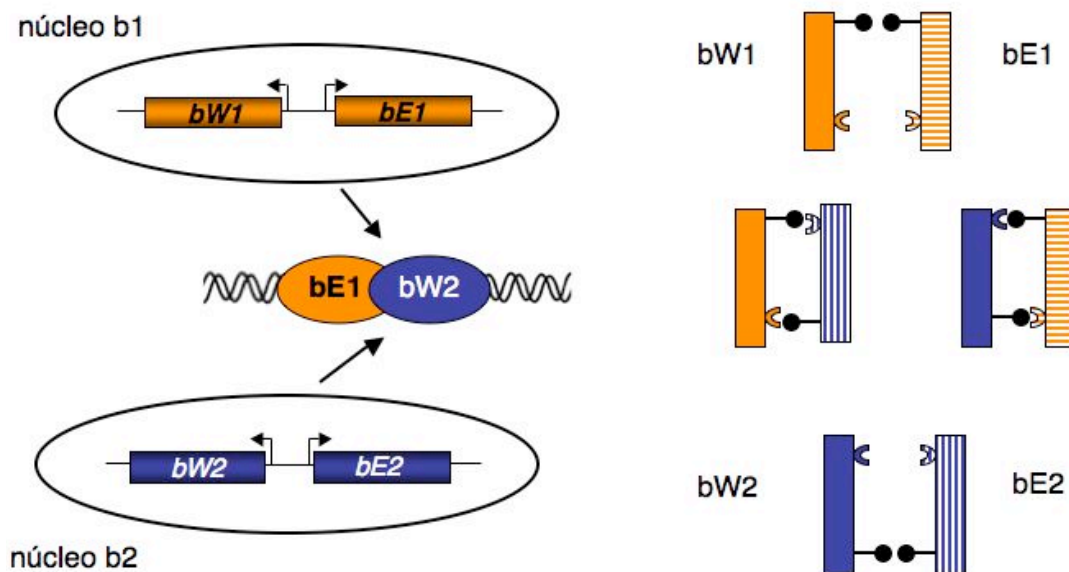


Figura 3. El locus *b*, un segundo sistema de reconocimiento. Esquema de dos núcleos compatibles para el locus *b* (un núcleo con el alelo *b1* y otro núcleo con el alelo *b2*). Las proteínas *bE* y *bW* dimerizan formando el factor de transcripción *b* sí y sólo sí provienen de núcleos distintos, reconociendo así, lo propio de lo no propio.

En el locus *b* se distingue una región variable y una región constante. La primera abarca una región de 1000 pares de bases que comprende la región codificante para los extremos amino terminal de *bE* y *bW* y las 200 pares de bases que separan ambos genes. La segunda comprende la secuencia que codifica para los extremos carboxilo terminal de cada proteína. Las proteínas *bE* y *bW* no están relacionadas a nivel de secuencia salvo por el motivo homeodominio de hongos localizado en la región constante (Schulz *et al.*, 1990; Gillisen *et al.*, 1992). Se ha descrito que la dimerización se realiza a través de la región variable, por lo que se propone un modelo de reconocimiento de lo propio y no propio mediado por la formación del heterodímero, estableciendo así un filamento infectivo hetero-dicarionte (Kämper *et al.*, 1995) (Fig. 3).

En los últimos años, se han realizado grandes esfuerzos por conocer los elementos regulados por el factor de transcripción *b*. En este sentido, se han descrito regiones denominadas bbs (*b-binding sites*) a las que se uniría el

heterodímero b (Brachmann *et al.*, 2001; Romeis *et al.*, 2000). Sin embargo, pocos de los genes involucrados en la patogénesis parecen ser regulados directamente por el factor de transcripción b (Kahmann y Kämper, 2004).

Como hemos mencionado anteriormente, la expresión de los genes del *locus b* y la consecuente formación del factor de transcripción b, produce, en primer instancia, el establecimiento del filamento infectivo dicarionte (Snetselaar y Mims, 1992). Este filamento es una única célula que presenta un crecimiento fuertemente polarizado y contiene los dos núcleos provenientes de las células que se aparearon sin dividirse (Fig. 4).

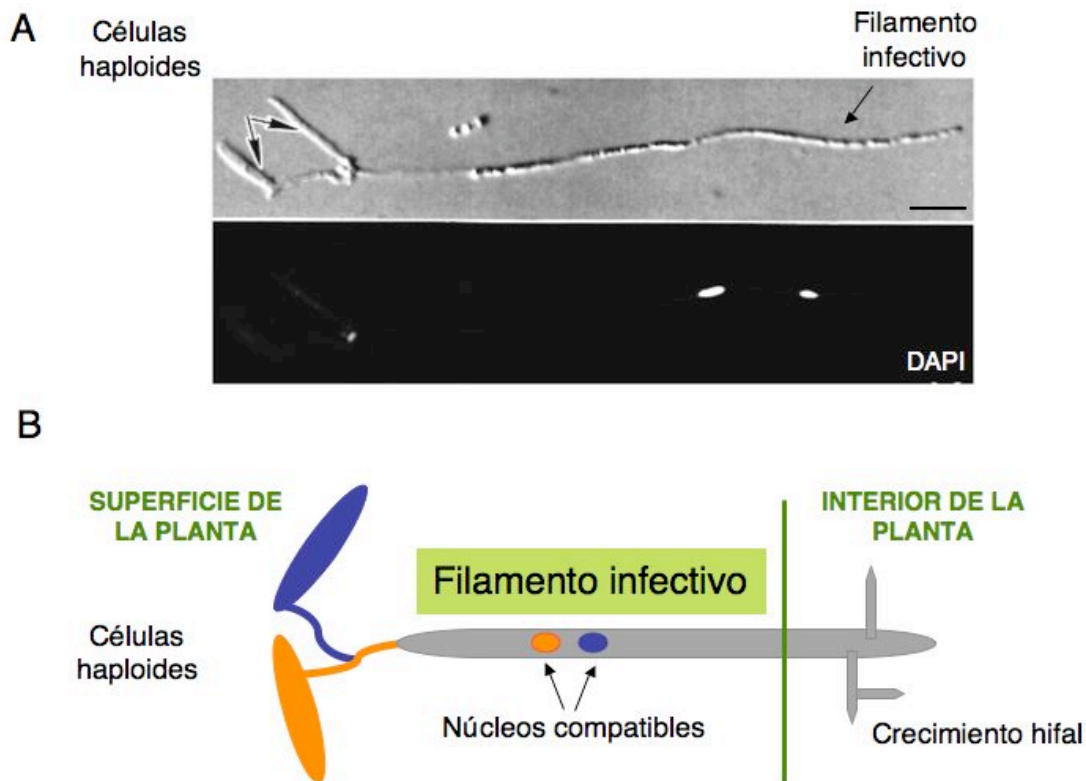


Figura 4. El filamento infectivo. La formación del filamento infectivo es inducida por el factor de transcripción b. Esta estructura es una célula hiperpolarizada dicarionte. **A.** Imagen microscópica del filamento infectivo formado tras el apareamiento de las células compatibles. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 12 μm . Figura adaptada de Snetselaar y Mims (1992). **B.** Esquema del filamento infectivo con sus núcleos compatibles sin dividirse sobre la superficie de la planta.

5. Regulación del ciclo celular

Como hemos comentado, el ciclo celular se detiene desde el reconocimiento de las células compatibles hasta que el filamento infectivo entra en el tejido vegetal. Por lo que conocer los elementos que regulan el ciclo puede ayudar a comprender el desarrollo de la enfermedad. A continuación se comentan algunas nociones generales de ciclo celular y de la regulación del ciclo en *U. maydis*.

5.1 El ciclo celular

En los organismos eucariotas el ciclo celular se divide en cuatro fases: G1, S (síntesis de ADN), G2 y M (mitosis). En general, durante la fase G1 la célula percibe las señales del medio que indicarán si las condiciones son o no las adecuadas para comenzar una ronda de ciclo celular. Mientras que en la fase G2 se producen los principales puntos de control internos, de forma que las células controlan la correcta duplicación del ADN y se preparan para la segregación de la información genética (Smits y Medema, 2001) (Fig. 5). La progresión ordenada a través del ciclo celular está controlada por distintos mecanismos moleculares que regulan la dependencia de un evento sobre otro. Así por ejemplo, las células previenen la entrada en mitosis si no ha ocurrido la duplicación de ADN. Por otra parte, los puntos de control, como los de daño a ADN, también modulan la progresión del ciclo celular (Smits y Medema, 2001).

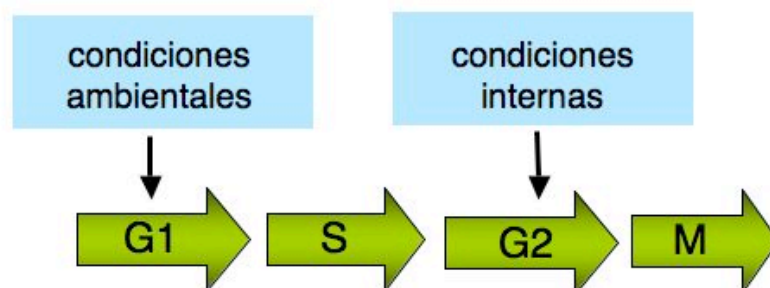


Figura 5. Esquema general del ciclo celular. Se indican las distintas fases del ciclo: G1: fase donde se controlan las condiciones ambientales y el tamaño celular, S: duplicación del ADN, G2: fase de control de las condiciones internas, M: separación del contenido genético.

Los complejos CDK/CICLINA son los reguladores universales del ciclo celular, donde cada complejo regula una transición específica del ciclo celular (Nigg, 1995). En los hongos existe una única CDK esencial para el transcurso de todo el ciclo, mientras que en eucariotas superiores se describen distintas CDKs (Nasmyth, 1993; Morgan, 1997). Existen distintos tipos de ciclinas, específicas de las distintas fases del ciclo (Sherr, 1993). Estas proteínas son reguladas por distintos mecanismos como la sublocalización celular, síntesis y degradación por proteólisis (Pines y Hunter, 1991; Morgan, 1997).

La activación de los complejos CDK/CICLINA requiere la fosforilación de un residuo de treonina conservado en la proteína CDK por una quinasa CAK (*CDK-activating kinase*) (Morgan, 1995, 1997). Por otra parte, la actividad quinasa de los complejos CDK/CICLINA puede ser inhibida por la unión de unas proteínas de bajo peso molecular denominadas CKIs (*CDK-Inhibitory subunits*) (Morgan, 1995, 1997; Sherr y Roberts, 1995). Otro mecanismo de inhibición muy bien caracterizado es la fosforilación inhibitoria de los complejos CDK/CICLINA (Gould y Nurse, 1989; Coleman y Dunphy, 1994, Morgan, 1995, 1997), según el cual la actividad quinasa es inactivada mediante la fosforilación de residuos de tirosina y/o treonina altamente conservados entre distintos organismos. La fosforilación de estos residuos es llevada a cabo por quinasas de la familia Wee1 (Lundgren *et al.*, 1991; Den Haese *et al.*, 1995) proceso que es revertido por fosfatasas de la familia de Cdc25 (Russel y Nurse, 1986; Millar *et al.*, 1991).

6. El ciclo celular en *U. maydis*

6.1 Relación entre ciclo celular y morfología

U. maydis es una levadura que crece de forma polar (Jacobs *et al.*, 1994). La formación de la gema se inicia en la fase G2 una vez que se ha completado la duplicación del ADN (Steinberg *et al.*, 2001). Durante esta fase, la gema crece hasta alcanzar casi el tamaño necesario para ingresar en una nueva ronda de ciclo, por lo que la fase G2 está caracterizada por concentrar el crecimiento polar. En la fase G2, el núcleo se encuentra en la célula madre hasta que,

previamente a la mitosis, migra hacia la gema (Steinberg *et al.*, 2001). A diferencia de otras levaduras, la membrana nuclear se dispersa durante la mitosis (Straube *et al.*, 2005). Los microtúbulos presentan una disposición característica en las fases del ciclo celular de *U. maydis*. Durante la metafase, forman un cuerpo polar corto que se estira luego de la transición metafase-anafase. Mientras que en las fases G1, S y G2, los microtúbulos se disponen en forma de haces que se extienden hacia los polos de las células (Steinberg *et al.*, 2001; Straube *et al.*, 2005) (Fig. 6).

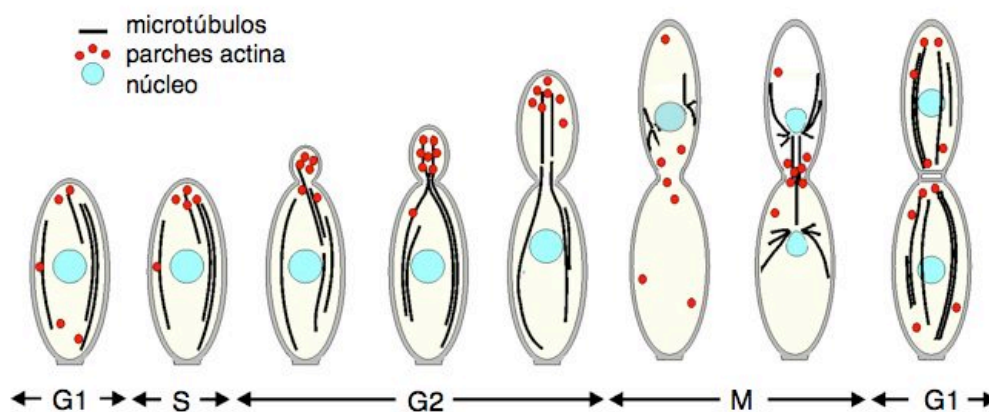


Figura 6. Relación entre morfología y el ciclo celular en *U. maydis*. El crecimiento de la gema ocurre durante la fase G2. Antes de la mitosis el núcleo migra hacia la gema. Se observan haces de microtúbulos en todas las fases, salvo en M cuando se forma el cuerpo polar. Los microtúbulos se indican con líneas negras, el núcleo en celeste y en rojo los parches de actina. Figura adaptada de Pérez-Martín *et al.*, 2006.

6.2 La regulación del ciclo celular en *U. maydis*

En los últimos años se han caracterizado varios elementos reguladores del ciclo celular de *U. maydis* (García-Muse *et al.*, 2004; Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005). En estos trabajos se ha descrito la presencia de una subunidad catalítica CDK, la quinasa Cdk1, que se asocia a tres subunidades reguladoras: una ciclina de G1, Cln1 y dos ciclinas de tipo B, Clb1 y Clb2. El complejo formado por Cdk1/Cln1 está implicado en la regulación de la transición G1/S y el complejo formado por Cdk1/Clb2 en la transición G2/M. Mientras que el complejo Cdk1/Clb1 está involucrado en ambas transiciones del ciclo celular. Los genes *cdk1*, *clb1* y *clb2* son esenciales, mientras que *cln1* no lo es.

En resumen, la proteína Cln1 está implicada en la regulación de la duración de

la fase G1, el tamaño y la morfología celular (Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005). La ausencia de *cln1* provoca un retraso en la fase G1 y afecta la morfología provocando células redondeadas mientras que la sobreexpresión presenta un crecimiento fuertemente polarizado. Por otra parte, la ciclina Clb2 es esencial para la transición de G2/M determinando la longitud de la fase G2. La represión de la expresión de *clb2* produce células paradas en fase G2 mientras que la sobreexpresión produce una entrada rápida en mitosis caracterizada por células que no producen gemas, sino que se separan por tabiques (García-Muse *et al.*, 2004). Por último, como la ciclina Clb1 está involucrada en las transiciones G1/S y G2/M la represión del gen *clb1* afecta ambos pasos del ciclo celular resultando en dos poblaciones celulares claramente distinguibles. Por un lado, se describen células paradas en G1, caracterizadas por la ausencia de gemas y por otro lado células paradas en G2 caracterizadas por células con gemas alargadas (García-Muse *et al.* 2004). Altos niveles de Clb1 resultan en problemas de segregación cromosómica (García-Muse *et al.* 2004).

También se han caracterizado algunas formas de regulación de las ciclinas y de los complejos CDK/CICLINA (Castillo-Lluva *et al.* 2004; Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b). Así, los niveles de ciclina Clb1 son regulados negativamente en la fase G1 por Cru1, adaptador del complejo APC (**Anaphase-Promoting Complex**). Esta regulación parece ser importante para retrasar el paso en G1 y permitir alcanzar un tamaño suficiente para iniciar la replicación del ADN y posteriormente entrar en mitosis en buenas condiciones (Castillo-Lluva *et al.* 2004).

Por otra parte, la transición G2/M es regulada por fosforilación inhibitoria del complejo Cdk1/Clb2 (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). De forma tal que la expresión de una versión de Cdk1 refractaria a la fosforilación inhibitoria (la versión Cdk1^{AF} donde los residuos treonina 14 y tirosina 15 fueron sustituidos por los residuos no fosforilables alanina y fenilalanina respectivamente) provoca una entrada rápida en mitosis caracterizada por células que tabican y que pueden presentar más de un núcleo por compartimento celular (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). Se ha descrito que la quinasa Wee1 de *U. maydis* está

implicada en la regulación de este proceso (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). La represión de *wee1* provoca una entrada rápida en mitosis asociada a una caída en los niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1. Mientras que la sobreexpresión de *wee1* provoca una parada del ciclo celular en G2. Por otra parte, la fosfatasa Cdc25 estaría implicada en la reversión de este proceso (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 b). En este caso, la sobreexpresión de Cdc25 provoca una entrada rápida en mitosis asociada a una caída de niveles de fosforilación del residuo Y15 de Cdk1. Mientras que la regulación negativa de *cdc25* provoca una parada del ciclo celular en G2 caracterizada por células con gemas alargadas (Fig. 7).

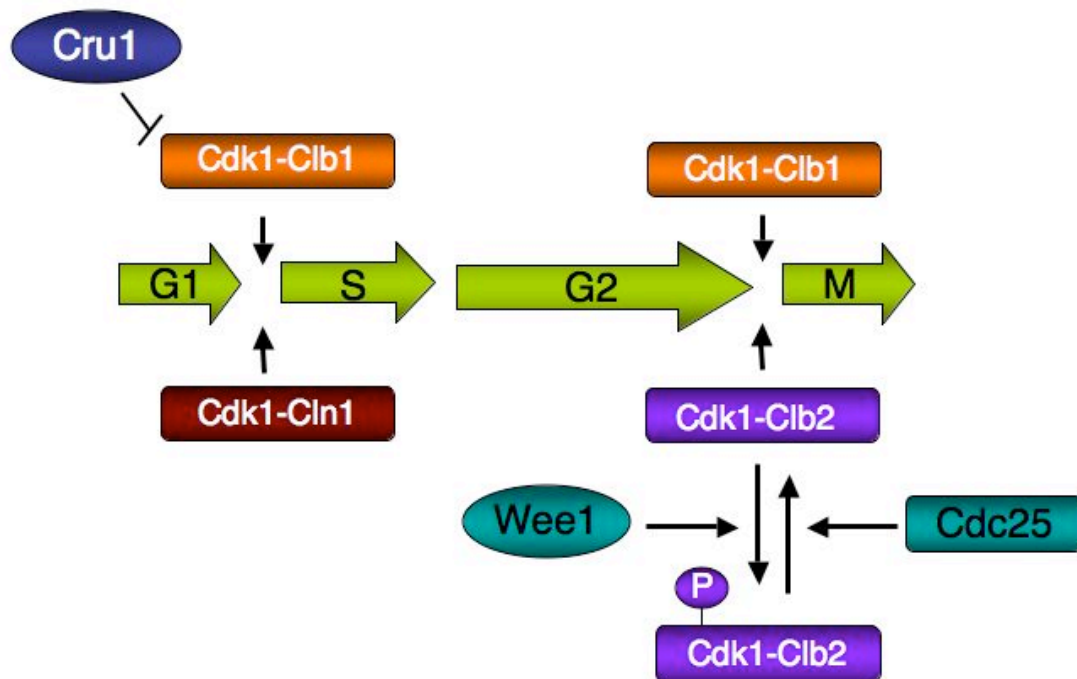


Figura 7. Principales reguladores caracterizados del ciclo celular de *U. maydis*. El complejo Cdk1/Clb1 interviene en las transiciones G1/S y G2/M, el complejo Cdk1/Cln1 en la transición G1/S y el complejo Cdk1/Clb2 en el paso G2/M. Cru1 es un regulador de la ciclina Clb1 en la fase G1. El complejo Cdk1/Clb2 es regulado por fosforilación inhibitoria.

7. Regulación de la transición G2/M

En organismos modelo de estudio se han descrito distintas formas de regulación de las proteínas Wee1 y Cdc25 (Smits y Medema, 2001; Perry y Kornbluth, 2007). Sin embargo poco sabemos sobre estos mecanismos en *U. maydis*. A continuación se resumen algunos mecanismos con el objeto de poder establecer si en *U. maydis* existen similares implicados en la regulación del paso G2/M.

7.1 Las proteínas 14-3-3 en la regulación del ciclo celular

Las proteínas 14-3-3 son un grupo de pequeñas proteínas altamente conservadas que reconocen y se unen a motivos fosforilados en otras proteínas modulando su función. La unión con sus sustratos puede modificar la actividad del sustrato, o modificar su interacción con otras proteínas o alterar su localización celular (Darling *et al.*, 2005). Como las proteínas sustrato pueden ser muy variadas, estos reguladores están involucrados en diversos procesos como transducción de señales, regulación del ciclo celular, apoptosis y respuesta a estrés.

En mamíferos se han caracterizado 7 genes distintos que pueden formar homodímeros y heterodímeros (Hermeking y Benzinger, 2006). Se ha propuesto que las proteínas 14-3-3 podrían regular distintas fases del ciclo celular a través de la regulación de distintas proteínas, como por ejemplo la duración de la fase G1 a través de la regulación de p27 o del complejo CDK2/Ciclina E (Hermeking y Benzinger, 2006). Sin embargo, como se comenta más adelante, nos interesa destacar el papel de estas proteínas como reguladores de la transición G2/M a través del secuestro de la fosfatasa Cdc25 en el citoplasma (Peng *et al.*, 1997). En *Xenopus laevis* también se ha descrito y caracterizado este mecanismo de regulación de la fosfatasa Cdc25 (Kumagai *et al.*, 1998).

En *Saccharomyces cerevisiae* existen dos proteínas de esta familia Bmh1p y Bmh2p. La disrupción de un solo gen no tiene efecto mientras que la de ambos es letal en la mayoría de los fondos genéticos (van Exuden y Steensma, 2006).

Estas proteínas están implicadas en la transición G1/S a través de la regulación del complejo SBF (**Swi4/Swi6 *Binding Factor***) (Lottersberger *et al.*, 2006). La regulación de este complejo modula la activación transcripcional de las ciclinas de G1 *CLN1* y *CLN2* que son requeridas para la entrada en la fase S. Recientemente se ha propuesto que Bmh1p y Bmh2p facilitan la función de Rad53 (homólogo de Chk2) *in vivo*. En este caso, la señal de control de daño se amplifica por un mecanismo que no involucra a Mih1 (homólogo de Cdc25) (Usui y Petrini, 2006).

En *Schizosaccharomyces pombe* también se han descrito dos proteínas del tipo 14-3-3, Rad24 y Rad25 (van Exuden y Steensma, 2006). En este caso están implicadas en la transición G2/M a través de la regulación de la localización de Cdc25 (López-Girona *et al.*, 1999).

Regulación de Cdc25 a través de 14-3-3

Durante la interfase y en situaciones de daño a ADN o estrés, las proteínas Cdc25 pueden ser retenidas en el citoplasma a través de la interacción con proteínas 14-3-3 (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006). Esta unión se produce por el reconocimiento de un motivo fosforilado en Cdc25 provocando un retraso en la fase G2. En algunos organismos, se ha sugerido que la unión de 14-3-3 a Cdc25 podría enmascarar una señal de localización nuclear provocando la exclusión de la proteína sin afectar su actividad (Kumagai y Dunphy, 1999). Mientras que otros se especula que la unión entre 14-3-3 y Cdc25 protege a la fosfatasa en el citoplasma en una forma inactiva (López-Avilés *et al.*, 2005). Aún no queda claro si este mecanismo es exclusivo de situaciones de estrés que provocan un retraso en la fase G2 o si es parte de la regulación normal del ciclo celular (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

Se han caracterizado varias quinasas en distintos organismos capaces de fosforilar estos motivos y de promover la unión entre 14-3-3 y Cdc25. Nos centraremos en las quinasas implicadas en la regulación de la transición G2/M, Chk1, MK2, Srk1, aunque también se ha caracterizado otra quinasa de respuesta a daño a ADN, Chk2/Cds1, capaz de fosforilar a Cdc25. Sin embargo, en este caso el mecanismo podría no involucrar a 14-3-3, puesto que

la fosforilación de Cdc25 podría estar involucrada en la degradación de la fosfatasa, o estar asociado a otro punto de control como el de replicación (Zeng *et al.*, 1998; Furnari *et al.*, 1999; McGowan, 2002; Donzelli y Draetta, 2003).

En *Homo sapiens* las fosfatasas Cdc25 son fosforiladas por la quinasa de control de daño a ADN Chk1 (Peng *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006) y por la quinasa activada por la ruta p38/MAPK MK2 que también está involucrada en el control de daño a ADN (Manke *et al.*, 2005). Los motivos de fosforilación de Chk1 y MK2 son muy similares y se sugiere que podrían compartir blancos sobre Cdc25 (O'Neill *et al.*, 2002; Manke *et al.*, 2005; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006). También se ha descrito otra quinasa asociada a Cdc25 C-TAK1 que sería capaz de fosforilar a Cdc25 promoviendo la unión a proteínas 14-3-3 durante la interfase (Peng *et al.*, 1998). En *S. pombe* la quinasa de control de daño a ADN Chk1 (López-Girona *et al.*, 1998; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006) y la quinasa Srk1 activada por la ruta p38/Sty1 MAPK en respuesta a estrés osmótico (López-Avilés *et al.*, 2005) son las que fosforilan a la fosfatasa Cdc25 creando los sitios de unión a proteínas tipo 14-3-3. En este caso también se ha sugerido que los sitios de fosforilación de Chk1 podrían coincidir con los de Srk1 (López-Avilés *et al.*, 2005; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006).

De esta manera, los sitios de fosforilación sobre Cdc25 estarían integrando diferentes señales celulares que tienen un mismo resultado: el retraso del ciclo celular a través de la inhibición de la fosfatasa.

7.2 Poloquinasas, reguladores de la transición G2/M

Las poloquinasas son una familia conservada de enzimas que están implicadas en distintos organismos en diferentes puntos de la transición G2/M. En resumen, están involucradas en la regulación de la entrada a mitosis; la separación y maduración de los centrosomas; la transición metafase-anafase y la salida de mitosis; la formación de septos y citoquinesis (Nigg, 1998; Donaldson *et al.*, 2001). También se ha descrito que están implicadas en los procesos de adaptación y recuperación que siguen a los procesos de control de daño a ADN (van Vugt y Medema, 2004).

Estas proteínas presentan un dominio quinasa en el extremo amino terminal y una región que contienen dos *POLO_box* característicos que se encuentran en el extremo carboxilo terminal. Nos referiremos a esta región como dominio polo. El dominio polo es crítico para la localización y función de la proteína (Lowery *et al.*, 2004). Se ha descrito que este dominio funciona como un módulo de unión a residuos de serina o treonina fosforilados, de forma que los sustratos de las poloquinasas deben ser marcados (“cebados”) previamente por otras quinasas (Elia *et al.*, 2003a; Elia *et al.*, 2003b). Es interesante destacar que el motivo de reconocimiento coincide con el de fosforilación por CDKs y MAP quinasas. Se proponen dos modelos de “acción” para el dominio polo: 1) un modelo donde la proteína cebada es también el sustrato de fosforilación de la poloquinasa (modelo procesivo). 2) Y un segundo modelo donde el sustrato al cual se une poloquinasa por su dominio polo es distinto del sustrato al cual va a fosforilar (modelo distributivo). La proteína cebada localizaría a la quinasa cerca de su proteína sustrato (Lowery *et al.*, 2004).

Por otra parte, el dominio polo participaría de la regulación de las propias poloquinasas. Se ha descrito que el dominio polo podría unirse a la proteína entera o al dominio catalítico e inhibir la actividad quinasa (Jang *et al.*, 2001) funcionando como un competidor de la proteína (Liu *et al.*, 2004). Se propone, por lo tanto, que el dominio polo podría plegarse sobre el dominio catalítico inhibiendo su actividad. Luego, ya sea por fosforilación de un residuo clave (ubicado en el dominio catalítico) en la activación de las poloquinasas o por unión al sustrato, el dominio polo dejaría expuesto al dominio quinasa (van de Weerd y Medema, 2006).

A continuación se describen las principales funciones de esta familia de proteínas en distintos organismos utilizados como modelo de estudio.

En *S. cerevisiae*, Cdc5p localiza en el anillo de septinas en el cuello de la gema desde la fase tardía G2 hasta la mitosis tardía y en el cuerpo polar (Park *et al.*, 2004). El gen *CDC5* es esencial, su represión presenta células con gemas con los núcleos casi separados pero aún conectados por un puente de cromatina (Lee *et al.*, 1997). Por ello, en este organismo, se ha propuesto que esta quinasa está involucrada en varios procesos relacionados con la regulación de

la progresión de la mitosis. Se ha propuesto que Cdc5p podría ser una de las quinasas involucradas en la fosforilación de Swe1 una vez que esta quinasa es localizada al cuello de la gema en el control de morfogénesis (Bartholomew *et al.*, 2001; Asano *et al.*, 2005). De esta forma la fosforilación sobre Swe1 integraría señales que indicarían que los eventos previos a mitosis se han completado permitiendo la entrada en esta fase del ciclo (Park *et al.*, 2003; Sakchaisri *et al.*, 2004). También se la ha implicado en varios procesos relacionados con la transición metafase-anafase a través de la regulación de cohesinas (Lee *et al.*, 2005), la salida de anafase mediante la regulación del complejo APC (Cheng *et al.*, 1998) y en la salida de mitosis a través de la regulación de las rutas FEAR (*Cdc Fourteen Early Anaphase Release*) y MEN (*Mitotic Exit Network*) (Lee *et al.*, 2005). Por otra parte, se ha observado que el proceso de adaptación (capacidad de “escapar” de los puntos de control de daño a ADN) parece ser dependiente de una Cdc5p funcional (van Vugt y Medema, 2004).

En *S. pombe*, *plo1* es un gen esencial requerido para la formación del cuerpo polar y la citoquinesis (Ohkura *et al.*, 1995). La pérdida de Plo1 provoca la parada del ciclo celular en mitosis con cromosomas condensados asociados a un cuerpo monopolar o a problemas asociados a la formación de septos luego de la división nuclear. Mientras que la sobreexpresión también presenta cuerpos monopolares pero con múltiples septos y sin división nuclear (Ohkura *et al.*, 1995). Se ha propuesto que la activación de Plo1 requiere la actividad del complejo quinasa MPF (*M-phase Promoting Factor*, que consiste en la CDK asociada a una ciclina B) que promueve la entrada en mitosis y que Plo1 actúa antes que la ruta SIN (*Septum Initiation Network*) en el control de la formación de los septos (Tanaka *et al.*, 2001). La formación del anillo de actina y del septo depende de la localización de la proteína en el cuerpo polar (Mulvihill y Hyams, 2002).

En mamíferos se han descrito cuatro poloquinasas, Plk1, Plk2, Plk3 y Plk4, mientras que en *Xenopus laevis* se han descrito tres, Plx1-3, siendo Plk1 y Plx1 las más caracterizadas hasta el momento (Van de Weerd y Medema, 2006). Plk1 presenta una localización muy dinámica en el ciclo celular, se encuentra

en el citoplasma y en el núcleo durante la fase G2 y en la mitosis temprana se localiza en los centrosomas y en el cinetocoro. Finalmente una fracción de la proteína se encuentra en la zona mediana de la célula en la mitosis tardía (van de Weerd y Medema, 2006).

Promover la entrada a mitosis es una de las funciones principales asignadas a Plk1 y Plx1 (van de Weerd y Medema, 2006). La iniciación de la mitosis requiere la localización nuclear y activación del complejo CDK/CiclinaB. A su vez, la activación del complejo resulta de la inhibición de las quinasas de la familia Wee y de la activación de las fosfatasa Cdc25. Plk1 interviene en todos esos pasos activando complejo CDK/Ciclina B y promoviendo la entrada en mitosis (van Vugt y Medema, 2005; van de Weerd y Medema, 2006). En primer lugar fosforila a Cdc25C sobre una señal de exportación nuclear promoviendo la localización fosfatasa en el núcleo (Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002). Recientemente también se ha sugerido que Plk1 y Plx1 podrían estar implicadas en la activación catalítica de Cdc25 (van Vught y Medema, 2005). Por otro lado, Plk1 también fosforilaría a Wee1 marcándolo para su degradación (Watanabe *et al.*, 2004). Por último, Plk1 fosforilaría a las Ciclinas B en el centrosoma, el primer lugar donde se describe la activación de los complejos CDK/Ciclina B (van Vugt y Medema, 2005). No queda claro si la fosforilación promueve la localización al núcleo o si activa al complejo de otra forma. En *X. laevis* se ha demostrado que Plx1 es requerida para la activación del complejo CDK/Ciclina B (Abrieu *et al.*, 1998) y la activación de Cdc25C (Qian *et al.*, 2001).

Entre otras múltiples funciones de Plk1 en la regulación de la transición G2/M podemos citar: la disociación de cohesinas, el alineamiento de los cromosomas, la activación del complejo APC y citoquinesis (van de Weerd y Medema, 2006). Plk1 también ha sido implicada en los procesos de control de daño a ADN como blanco del mecanismo de control (Smits *et al.*, 2000) y en el proceso de recuperación que promueven la entrada en el ciclo celular luego de la parada producida por control de daño a ADN (van Vugt *et al.*, 2004).

7.3 Nim1/Cdr1, reguladores de Wee1

Las proteínas Nim1/Cdr1 son una familia serin-treonin quinasas. Estas proteínas han sido descritas como reguladores positivos del paso G2/M, por ello comentaremos brevemente el papel de esta quinasa en distintos organismos.

En *S. pombe* existen dos proteínas de esta familia, Nim1/Cdr1 y Cdr2. La proteína Nim1 fue descrita como un regulador promitótico puesto que fosforila e inhibe a Wee1 promoviendo el paso a mitosis (Parker *et al.*, 1993). Debido a que Nim1 localiza en el citoplasma mientras que su sustrato Wee1 se encuentra en el núcleo, se ha propuesto que la localización de estas proteínas podría coordinar la regulación del complejo CDK/Ciclina B en el núcleo con eventos citoplasmáticos (Wu *et al.*, 1996). Nim1 también ha sido implicada en la adaptación a cambios nutricionales, integrando señales nutricionales con la maquinaria del ciclo celular (Belenguer *et al.*, 1997). La proteína quinasa Cdr2 también regula la entrada a mitosis, probablemente a través de Wee1 (Kano y Russell, 1998).

En *S. cerevisiae* existen tres proteínas relacionadas con Nim1/Cdr1, las proteínas Hsl1p, Kcc4p y Gin4p (Barral *et al.*, 1998). Se ha propuesto que las tres proteínas están involucradas en control de morfogénesis, coordinando la progresión del ciclo celular con los eventos en la corteza, aunque Hsl1p ha sido la proteína más caracterizada (Barral *et al.*, 1998; McMillan *et al.*, 2002; Hanrahan y Snyder, 2003; Lew, 2003). Se propone que Hsl1p podría controlar el correcto ensamblado de las septinas en el cuello de la gema, y luego reclutar a Swe1p a través de la proteína Hsl7p (Shulewitz *et al.*, 1999; Cid *et al.*, 2001). Una vez en el cuello, quinasas como Cdc5p serían capaces de fosforilar a Swe1p marcándolo para degradación (Sakchaisri *et al.*, 2004; Asano *et al.*, 2005) promoviendo la progresión del ciclo celular. De acuerdo con estos modelos se han descrito en el extremo carboxilo de Hsl1p regiones de unión a septinas y de unión a Hsl7p relevantes para el control de morfogénesis (Shulewitz *et al.*, 1999; Cid *et al.*, 2001; Hanrahan y Snyder, 2003).

8. Ciclo celular y patogénesis en *U. maydis*

Como se ha comentado en esta introducción, existen evidencias que sugieren que la regulación del ciclo celular, en particular la regulación de la transición G2/M juega un papel decisivo en el proceso de infección de *U. maydis*. Por un lado, el ciclo celular se detiene en G2 luego del reconocimiento entre células compatibles, y si no se produce la parada de ciclo se afecta el proceso de apareamiento (García-Muse *et al.*, 2003; Sgarlata, 2005). Por otra parte, la regulación de distintos elementos del ciclo es fundamental para completar el proceso de infección (García-Muse *et al.*, 2004, Castillo-Lluva *et al.*, 2005; Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005). Con estos datos, se ha sugerido la existencia de una regulación negativa entre ciclo activo y apareamiento. De forma tal que la entrada en el programa sexual es incompatible con un ciclo celular activo (Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005).

Sin embargo, poco sabemos de la parada de ciclo celular una vez que se ha establecido el filamento dicarionte. En estudios anteriores, se ha sugerido que los núcleos del filamento infectivo están detenidos en la fase G2 (Sgarlata, 2005), aunque poco sabemos sobre el papel del heterodímero b, responsable de la formación del filamento y del proceso patogénico, sobre esta parada de ciclo, ni cuáles son los reguladores y mecanismos involucrados.

En este trabajo nos hemos propuesto estudiar la parada de ciclo observada en el filamento infectivo. Para ello, también hemos caracterizado nuevos reguladores del ciclo celular de *U. maydis*. En esta memoria se comentan primero los resultados relacionados con la parada del ciclo celular que ocurre en el proceso patogénico durante la formación filamento infectivo y a continuación se comenta la caracterización, más o menos extensa según el caso, que se hizo de los posibles reguladores implicados en la parada del ciclo celular.

Objetivos

Con los antecedentes comentados en la sección anterior nos planteamos los siguientes objetivos en este trabajo:

1. Caracterizar la parada del ciclo celular que ocurre en el filamento infectivo durante el proceso patogénico del hongo *Ustilago maydis*.
2. Caracterizar nuevos reguladores del ciclo celular de *Ustilago maydis* implicados en la regulación de la transición G2/M y en la parada de ciclo antes mencionada. Estos reguladores fueron las proteínas Bmh1, Plk1 y Hsl1.

Materiales y Métodos

1. Estirpes y plásmidos

A continuación se enumeran las estirpes de *Ustilago maydis* con sus características genéticas más relevantes (Tabla 1) y los plásmidos (Tabla 2) utilizados en este trabajo.

Tabla 1. Características genéticas de las estirpes de *U. maydis*

Estirpe	Genotipo	Origen	Referencia
FB1	<i>a1b1</i>	521x518	Banuett & Herskowitz, 1989
FB2	<i>a2b2</i>	521x518	Banuett & Herskowitz, 1989
FBD11	<i>a1b1 a2b2</i>	521x518	Banuett & Herskowitz, 1989
AB31	<i>a2 P_{crg1}:bE1 P_{crg1}:bW2</i>	FB2	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB32	<i>a2 P_{crg1}:bE2 P_{crg1}:bW2</i>	FB2	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB33	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2</i>	FB2	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
AB34	<i>a2 P_{nar1}:bE2 P_{nar1}:bW2</i>	FB2	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
SG200	<i>a1 mfa2 bE1bW2</i>	FB1	Bölker <i>et al.</i> , 1995
MUM1	<i>a1b1 hsl1Δ::hyg</i>	FB1	Este trabajo
MUM21	<i>a1b1 a2b2 plk1Δ::hyg</i>	FBD11	Este trabajo
MUM22	<i>a1b1 plk1^{nar1} (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM23	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R) P_{crg1}:plk1-HA (cbx^R)</i>	MUM26	Este trabajo
MUM26	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM27	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R) P_{crg1}:cdc25-myc (cbx^R)</i>	MUM26	Este trabajo
MUM28	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R) wee1^{nar1} (cbx^R)</i>	MUM26	Este trabajo
MUM29	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R) P_{crg1}:cdk1^{AF}-myc (cbx^R)</i>	MUM26	Este trabajo
MUM30	<i>a1b1plk1^{nar1} (hyg^R) P_{crg1}:cdk1-myc (cbx^R)</i>	MUM26	Este trabajo
MUM31	<i>a1b1P_{crg1}:cdk1^{AF}-myc (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM32	<i>a1b1P_{crg1}:cdk1-myc (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM33	<i>a1b1 P_{crg1}:plk1-HA (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM37	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 plk1^{tef1} (cbx^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM38	<i>a1 mfa2 bE1bW2 plk1^{tef1} (cbx^R)</i>	SG200	Este trabajo
MUM46	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 clb1^{tef1} (hyg^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM53	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 P_{nar1}: hsl1-HA (cbx^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM57	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 P_{cdc25}cdc25^{AAA} (cbx^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM58	<i>a2P_{nar1}:bE1P_{nar1}:bW2 P_{cdc25}cdc25 (cbx^R)</i>	AB33	Este trabajo

MUM59	<i>a1b1 P_{crg1}: T7-polobox (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM60	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 P_{dike}cdc25(cb^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM61	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 par1Δ::cbx</i>	AB33	Este trabajo
MUM62	<i>a2 P_{crg1}:bE1 P_{crg1}:bW2 wee1^{nar1} (cbx^R)</i>	AB31	Este trabajo
MUM65	<i>a1b1 bmh1^{crg1} (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM66	<i>a1b1 cdc25^{nar1} (hyg^R) P_{cdc25}cdc25^{AAA} (cbx^R)</i>	UMC27	Este trabajo
MUM67	<i>a1b1 cdc25^{nar1} (hyg^R) P_{cdc25}cdc25(cb^R)</i>	UMC27	Este trabajo
MUM68	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 bmh1^{crg1} (cbx^R)</i>	AB33	Este trabajo
MUM72	<i>a1b1 cdc25-3GFP (hyg^R)</i>	FB1	Este trabajo
MUM74	<i>a1 mfa2 bE1bW2 P_{plk1}NLS-3GFP (cbx^R)</i>	SG200	Este trabajo
MUM78	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 P_{nar1}: hsl1-HA (cbx^R); P_{tef1}tub1-GFP (hyg^R)</i>	MUM53	Este trabajo
MUM81	<i>a1b1 cdc25-3GFP (hyg^R) bmh1^{crg1} (cbx^R)</i>	MUM72	Este trabajo
MUM83	<i>a1b1 cdc25^{nar1} (hyg^R) bmh1^{crg1} (cbx^R)</i>	UMC27	Este trabajo
SONU58	<i>a1b1 P_{crg1}:cln1-myc</i>	FB1	C-Lluva y P-Martín, 2005
UMC18	<i>a2 P_{nar1}:bE2 P_{nar1}:bW2 P_{nar1}:cdk1^{AF}-myc (cbx^R)</i>	AB34	Sgarlata, 2005
UMC20	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 P_{nar1}:cdk1^{AF}-myc (cbx^R)</i>	AB33	Sgarlata, 2005
UMC27	<i>a1b1 cdc25^{nar1} (hyg^R)</i>	FB1	Sgarlata y P-Martín, 2005 b
UMC49	<i>a1b1 P_{crg1}:cdc25 (cbx^R)</i>	FB1	Sgarlata y P-Martín, 2005 b
UMC50	<i>a1b1 wee1^{nar1} (cbx^R)</i>	FB1	Sgarlata y P-Martín, 2005 a
UME61	<i>a1b1 crk1Δ::hyg P_{crg1}:crk1-myc (cbx^R)</i>	UMP12	Garrido <i>et al.</i> , 2004
UMN4	<i>a1b1 fuz7^{DDcrg1} (cbx^R)</i>	FB1	Flor-Parra, 2006
UMP73	<i>a1b1 P_{crg1}rac1 (cbx^R)</i>	FB1	Colección laboratorio
UMP101	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 srk1Δ::cbx</i>	AB33	Este trabajo
UMP102	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 clb1-myc</i>	AB33	Este trabajo
UMP103	<i>a2 P_{nar1}:bE2 P_{nar1}:bW2 clb1-myc</i>	AB34	Este trabajo
UMP104	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 clb2-myc</i>	AB33	Este trabajo
UMP105	<i>a2 P_{nar1}:bE2 P_{nar1}:bW2 clb2-myc</i>	AB34	Este trabajo
UMP111	<i>a1b1 bmh1-RFP (nat^R)</i>	FB1	Este trabajo
UMP112	<i>a1b1 bmh1-RFP (nat^R) cdc25-3GFP (hyg^R)</i>	MUM72	Este trabajo
UMP114	<i>a2 P_{nar1}:bE1 P_{nar1}:bW2 chk1Δ::cbx</i>	AB33	Este trabajo
UMP118	<i>a1b1 chk1Δ::cbx</i>	FB1	Este trabajo
UMP120	<i>a1b1 bmh1^{crg1T7} (cbx^R)</i>	FB1	Este trabajo

UMP125	<i>a1b bmh1-HA (hyg^R) P_{arg1}:cdc25-myc</i>	FB1	Este trabajo
	(<i>cbx^R</i>)		
UMP126	<i>a1b bmh1-HA (hyg^R) P_{arg1}:cdc25^{AAA}-myc</i>	FB1	Este trabajo
	(<i>cbx^R</i>)		

Tabla 2. Plásmidos

Vectores utilizados	Procedencia
pCU2	Hartmann <i>et al.</i> , 1996
pCU3	Hartmann <i>et al.</i> , 1996
pRU11	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
pRU2	Brachmann <i>et al.</i> , 2001
pMF5-2n	Bech <i>et al.</i> , 2006
pMF5-4h	http://staff-www.uni-marburg.de/~ felbrue/
pUMa260	Brachmann <i>et al.</i> , 2004
pUMa261	Brachmann <i>et al.</i> , 2004
pMS76	Scherer <i>et al.</i> , 2006
pRU2 HYG	Colección laboratorio
pGNB-HA	Colección laboratorio
pRU11-T7	Colección laboratorio
pBS-HA	Colección laboratorio
pGEMHyg	Colección laboratorio
pCLB2-MYC	Colección laboratorio
pCLB1-MYC	Colección laboratorio
pCU3clb1tef	Flor-Parra, 2006
pCU3cdk1AFmyc	Sgarlata, 2005
pCU3cdk1myc	Sgarlata, 2005
pRU11cdc25myc	Sgarlata, 2005
pGEMT easy vector	PROMEGA

2. Medios y condiciones de cultivo

2.1 Medios y condiciones generales

Las estirpes de *U. maydis* se cultivaron en medios ricos, definidos o pobres según las características de crecimiento de la estirpe y del experimento. Como medio de cultivo rico y definido se utilizaron las recetas descritas por Holliday (1974) y Kaiser *et al.* (1994). En resumen, los medios ricos **YP** fueron preparados con extracto de levadura y bactopectona, mientras que los medios definidos **CM** fueron preparados con casaminoácidos, extracto de levadura, vitaminas y sales de Holliday. Los medios mínimos, que podían contener nitrato (**MMNO₃**) o amonio (**MMNH₄**) como fuente de nitrógeno, se prepararon siguiendo la receta descrita por Alfa *et al.* (1993). En todos los casos se utilizó glucosa (**D**) o arabinosa (**A**) como fuente de carbono al 1%. En los medios mínimos, salvo que se indique, la fuente de carbono utilizada fue glucosa.

En medio líquido, las estirpes de *U. maydis* fueron crecidas a 28°C en agitación a 250 r.p.m. y en buenas condiciones de aireación (el volumen ocupado no era más de 1/5 del volumen total del recipiente utilizado). Las placas con medio sólido se incubaron en una estufa a 28°C.

Para el cultivo de *E. coli* se utilizó la receta de Luria-Bertoni (Sambrook *et al.*, 1989). De forma rutinaria las cepas se cultivaron a 37°C y se utilizó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Todos los medios de cultivo utilizados en este trabajo se prepararon con agua Milli-Rho.

2.2 Regeneración y selección de transformantes

Para regenerar protoplastos se utilizó agar de regeneración (Schulz *et al.*, 1990) preparado con extracto de levadura, bactopectona, sorbitol y sacarosa como fuente de carbono salvo en el caso de genes esenciales bajo la regulación del promotor *Pcrg1*, donde se utilizó arabinosa como fuente de carbono.

Para la selección de los transformantes se utilizaron los siguientes antibióticos: carboxina, 2 µg/ml; higromicina, 200 µg/ml o nourseotricina 150 µg/ml. En las

placas de regeneración se utilizaron al doble de concentración.

2.3 Ensayos de apareamiento y formación de filamentos

Para los ensayos de apareamiento se utilizaron placas de PD-charcoal (Holliday, 1974) puesto que sobre este medio las estirpes compatibles o solopatogénicas pueden realizar los procesos de apareamiento y de formación de filamentos que ocurren sobre la superficie vegetal. Para realizar el ensayo se crecieron las estirpes hasta una D.O._{600nm} de 0,5, se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se mezclaron y se sembraron con sus controles correspondientes. Las placas se sellaron con parafilm y se incubaron a temperatura ambiente de 24 a 48 horas.

2.4 Promotores regulables y constitutivos en *U. maydis*

Para los experimentos de expresión regulada se utilizaron los promotores *Pcrg1* inducible con arabinosa y reprimible con glucosa (Botín *et al.*, 1996), y *Pnar1* inducible con nitrato y reprimible con amonio o medio CM o YP (Brachmann *et al.*, 2001). Para los experimentos de inducción, se crecieron células en medio represor hasta una D.O._{600nm} de 0,8-1, se lavaron con agua destilada estéril tres veces y luego se transfirieron a medio inductor ajustando la D.O._{600nm} a 0,2. Para los experimentos de represión, se crecieron células en medio inductor y luego se transfirieron al medio represor. El tiempo de inducción/represión se detalla en cada experimento.

Para los experimentos de expresión constitutiva se utilizó el promotor constitutivo del factor de elongación de la transcripción *Ptef1* (Spellig *et al.*, 1996). Las células se crecieron en medio de cultivo hasta una D.O._{600nm} de 0,8-1 y luego se realizaron los análisis correspondientes a cada experimento.

2.5 Paradas de ciclo celular

Para los experimentos de análisis de expresión en las distintas fases del ciclo celular se indujo la acumulación de células en la fase G1, S o M. Para enriquecer los cultivos con células en la fase G1, se crecieron en medio mínimo sin nitrógeno durante 2 horas. Para enriquecer con células en la fase S, se

trataron con 1 mg/ml hidroxihurea durante 1 hora y media. Para enriquecer células en la fase M se trataron con 10 μ M benomilo durante 1 hora.

3. Metodologías genéticas

3.1 Construcción de plásmidos recombinantes

La extracción de ADN plasmídico procedente de *E. coli*, la digestión de ADN mediante el uso de enzimas endonucleasas, el tratamiento con fosfatasa alcalina, los análisis electroforéticos, la purificación de fragmentos de ADN y la ligación de fragmentos para la construcción de plásmidos recombinantes se realizaron según los métodos descritos por Ausubel *et al.* (1997). Las células competentes de *E. coli* se transformaron con plásmidos purificados o mezclas de ligación mediante el método de choque térmico descrito por Hanahan (1983).

3.2 Reacciones de amplificación

La reacción de amplificación con la ADN polimerasa termosensible se realizó en un termociclador. Las reacciones contenían 500nM de cada oligonucleótido, 10 ng de ADN molde, 200 μ M de cada dNTP y 1 unidad activa de polimerasa en 50 μ l de solución tamponada. El tiempo de elongación se ajustó según la longitud del fragmento a amplificar y la temperatura de anillado en función de los oligonucleótidos utilizados. Para amplificaciones de alta fidelidad se utilizaron las polimerasas Pwo (Roche) o Expand Long Template (Roche), mientras que para el resto de las amplificaciones se usó la polimerasa Taq.

3.3 Extracción de ADN genómico de *U. maydis*

La extracción de ADN genómico de *U. maydis* se realizó según el protocolo de Hoffman y Winston (1987). Según este protocolo, las células se lisaron por ruptura mecánica con tampón de lisis (10 mM tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% Triton) y el ADN se extrajo con una solución de fenol:cloroformo. Finalmente el ADN se resuspendió en 50-100 μ l de tampón TE (10 mM Tris-base, 1 mM Na₂-EDTA·H₂O) con 50 mg/ml RNasa.

3.4 Transformación de *U. maydis*

La transformación de las estirpes de *U. maydis* se realizó según el protocolo descrito por Schulz *et al.* (1990). En resumen, se utilizaron protoplastos obtenidos por método enzimático basado en el uso del complejo Novozym328. Las células se incubaron con el complejo enzimático en una solución de SCS (1 M sorbitol, 20 mM citrato de sodio pH 5,8, H₂O Milli-Q) hasta que se volvieron esféricas, se lavaron, se alicuotaron en STC (1 M sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM CaCl₂, H₂O Milli-Q) y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

La transformación se realizó en hielo incubando los protoplastos primero con una mezcla de heparina y ADN linealizado, y a continuación con una solución STC/40%PEG 3350. Finalmente se sembraron en placas de regeneración. Estas placas se prepararon en dos capas, la primera capa fue preparada con antibiótico 2X y la segunda capa fue preparada sin antibiótico, para asegurar la difusión paulatina del antibiótico. Las placas se incubaron a 28°C.

4. Metodologías para el tratamiento de ARN

4.1 Extracción de ARN de *U. maydis* crecido en cultivo líquido

Para la extracción de ARN total se siguió el protocolo de Schmitt *et al.* (1990). En resumen, el protocolo consistió en lisar las células mecánicamente con tampón de lisis TES (10 mM Tris-HCl pH7,5, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) y extraer el ARN con una solución de fenol ácido. La fase acuosa se lavó una vez con fenol ácido y luego con cloroformo:isoamílico. Luego se precipitó el ARN con AcNa 3M y se resuspendió en 50-100 μ l de H₂O-DEPC (0,1% Dietil pirocarbonato). Se midió la concentración de ARN por absorbancia a 260 nm. Las muestras de ARN se conservaron a -80°C hasta su utilización.

4.2 Extracción de ARN total de células crecidas en medio sólido

Para la extracción de ARN de estirpes crecidas sobre medio sólido se recogieron las células cultivadas sobre las placas correspondientes a cada experimento y se disgregaron en un mortero con nitrógeno líquido hasta obtener polvo. Se recogió el material y se volcó en un tubo para extracción de

ARN. A partir de aquí las muestras se trataron como las obtenidas de medio líquido.

4.3 Northern blot

Según este protocolo, las muestras de ARN total se separaron en un gel de 1% agarosa y 0,6% de formaldehído utilizando 20 mM MOPS, 5 mM AcNa y 10 mM EDTA como tampón de carrera. Se cargaron 10 μ g de muestra utilizando el siguiente tampón de carga: 43,5 mM MOPS, 11 mM AcNa, 2,2 mM EDTA, 9,6% formaldehído y 51% formamida. El ARN contenido en el gel se transfirió por capilaridad a una membrana Zeta-Probe® GT Genomic Tested Blotting Membranes y se fijó mediante un pulso de luz ultravioleta de 1200 J/m². Como control de carga y calidad se tiñó el ARN ribosomal de la membrana con azul de metileno (40 mg/100ml azul de metileno, 0,5 M AcNa pH 5,2). Posteriormente la membrana se prehibridó a 65°C al menos 2 horas con una solución de hibridación (0,2 M de tampón fosfato pH 7,2, 1 mM EDTA, 7% SDS). Luego se agregó la sonda desnaturalizada y se hibridó a 65°C durante al menos 16 horas. A continuación se realizaron tres lavados: 1) lavado breve o enjuague a temperatura ambiente con una solución 0,1% SDS - 2X SSC (20X SSC: 3M NaCl, 0,3M citrato de sodio·2H₂O); 2) lavado a 65 °C durante 30 minutos con la misma solución y 3) lavado a 65°C durante 30 minutos con una solución 0,1% SDS - 0,2X SSC. Finalmente la membrana se expuso en una pantalla (Storage Phosphor Screen, Amersham-Pharmacia Biotech) y se reveló en un detector adecuado (Molecular image®, Bio-Rad).

La sonda se marcó radiactivamente utilizando el sistema Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP) (Amersham), [α -³²P]dCTP (Amersham) y 50-100ng de ADN molde siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial. Luego se purificó con una columna ProbeQuant™ G-50 (Amersham-Pharmacia).

Para limpiar la radioactividad y reutilizar las membranas, se realizó un lavado de 10 minutos con 0,1% SDS a 100°C con agitación suave. Luego se siguió el protocolo desde la prehibridación de la membrana.

Las sondas utilizadas en este trabajo se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen de las sondas utilizadas en este trabajo

Sonda	Oligonucleótidos	Fragmento	Referencia
hsl1	hsl1-14 + hsl1-18	0,88 kb	Este trabajo
plk1	plk1-3 + plk1-11b	0,99 kb	Este trabajo
bmh1	1433-7 + 1433-8	0,75 kb	Este trabajo
clb2	clb2-3 + clb2-5	0,776 kb	Este trabajo
clb1	clb1-2 + clb1-5	0,750 kb	García-Muse <i>et al.</i> , 2004.
cdc25	cdc25-1 + cdc25-15	1 kb	Sgarlata, 2005
wee1	wee1-26 + wee1-27	1 kb	Sgarlata, 2005

5. Metodologías para el tratamiento de proteínas

5.1 Extracción de proteínas de *U. maydis*

La extracción de proteínas de *U. maydis* se realizó por ruptura mecánica de las células con tampón de lisis (125 mM Tris-ClH pH 6,8, 1% β -mercaptoetanol, 4% SDS, 0,005% azul de bromofenol, 20% glicerol, 5 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de proteasas Roche). Los lisados se incubaron durante 5 minutos a 100°C y se colocaron el hielo para su utilización inmediata o bien se congelaron a -80°C para un uso posterior.

Para realizar las inmunoprecipitaciones, las células se pre-trataron con el complejo Novozym328 para degradar la pared celular (ver Transformación de *U. maydis*). Luego se realizó una ruptura mecánica suave con el tampón de lisis BF (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,1% Tritón X100, 50 mM NaF, 1 mM β -glicerolfosfato, 1 mM EGTA, 12,5 mM pirofosfato de sodio, 0,1 mM NaVO_3 , 5 mM EDTA pH 8, 1 mM PMSF y 1/10ml pastilla de cocktail de inhibidor de proteasas Roche). Los lisados se trataron como se describe más adelante para su uso inmediato o se congelaron a -80°C para su utilización posterior.

5.2 Inmunoprecipitación

Para realizar las inmunoprecipitaciones se utilizó el sistema comercial Dynabeads® (Invitrogen) según las recomendaciones del fabricante. En resumen, el extracto porteico se incubó con tampón BF durante 2 horas, luego se agregó un volumen de bolitas magnéticas (resina con Proteína G unida a bolitas magnéticas) y finalmente se incubó una hora en agitación suave a 4°C. A continuación se realizaron 3 lavados con tampón BF y se resuspendió en el tampón de lisis descrito anteriormente. Los lisados se incubaron durante 5 minutos a 100°C y se colocaron el hielo para su utilización inmediata o bien se congelaron a -80°C para un uso posterior.

5.3 Western blot

Los extractos proteicos se separaron en geles de poliacrilamida del 8 al 10% (Laemmli, 1970) a voltaje constante con Tris-ClH/glicina/SDS (50 mM, 400 mM, 0,02% respectivamente) como tampón de carrera. El gel se electrotransfirió a una membrana Immobilon-P (Millipore) utilizando el sistema Mini Trans-blot® Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó en un tampón adecuado (48 mM Tris-ClH pH 7,5, 39 mM glicina, 0,0375% SDS, 20% metanol) a amperaje constante (0,15 Å por gel) durante 30-45 minutos según el tamaño de la proteína. El bloqueo y los lavados de la membrana se realizaron según el anticuerpo siguiendo la recomendación de la casa comercial. En este estudio se utilizaron los siguientes anticuerpos: α -[MYC-peroxidasa] (1:10.000, Roche), α -[PSTAIRE] (1:5.000, Santa Cruz), α -[HA-peroxidasa] (1:5.000, Roche), α -[T7-peroxidasa] (1:10.000, Novagen), α -[MYC] (1:10.000, Roche), α -[HA] (1:10.000, Roche) y anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa (1:10.000, Roche). Para revelar las membranas se utilizó el sistema de quimioluminiscencia NEN (Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus, Renaissance NEL105) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para reutilizar las membranas se limpiaron con un solución 0,1 M glicina, 1% SDS, 0,05% NP-40, pH 2,5 durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación suave. Luego se realizaron 3 lavados para quitar el exceso de la solución y se siguió el protocolo desde el bloqueo de la membrana.

6. Análisis de citometría de flujo (FACS)

Para el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo se siguió el protocolo descrito por Garrido y Pérez-Martín (2003). En resumen, según este protocolo las células se fijaron con etanol 70% y luego se trataron con 0,025 mg/ml de ARNasa A y 1 mg/ml de proteinasa K. Finalmente se incubaron con 16 μ g/ml de ioduro de propidio para la tinción del ADN. Se utilizó el equipo de citometría CoulterXL para analizar las muestras.

7. Microscopía

A continuación se detallan las metodologías utilizadas para la observación de núcleos, septos, microtúbulos y filamentos infectivos. Las muestras se observaron en microscopios Leica DMLB o Nikon Eclipse 90i. Las imágenes obtenidas fueron tratadas con los programas Metamorph y Adobe Photoshop.

7.1 Tinción de núcleos

Para la observación de los núcleos se utilizó una solución de DAPI (4', 6'-diamidino-2-fenilindol) preparada en PBS (0,043 M NaPO_4^3 , 0,014 M KPO_4^3 , 0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl). Las muestras se prepararon tomando un pequeño volumen de cultivo que se secó a temperatura ambiente sobre un portaobjetos. Luego se añadió la solución con DAPI a una concentración final de 1 μ g /ml y se colocó el cubreobjetos para la observación al microscopio.

7.2 Tinción de septos

Para la observación de los septos se utilizaron dos tinciones distintas. Una tinción con WGA-FITC (aglutina de germen de trigo asociada a fluorocromo) preparado en PBS (0,043 M NaPO_4^3 , 0,014 M KPO_4^3 , 0,137 M NaCl, 0,27 mM KCl) o una tinción con calcoflúor preparado en DMSO (dimetil- sulfóxido).

Para la tinción con WGA-FITC, que permitía realizar doble tinción con DAPI, las células se lavaron con PBS y luego se resuspendieron en WGA-FITC a una concentración final de 8 μ g/ml. A continuación se incubaron 15 minutos con

agitación suave en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente las células se volvieron a lavar con PBS y se montaron sobre el portaobjetos.

Para la tinción con calcoflúor se mezcló sobre el portaobjetos el cultivo con calcoflúor a una concentración final de 0,2 mg/ml. Luego se eliminó el exceso del compuesto.

7.3 Tinción de filamentos infectivos en la planta

Para observar los filamentos infectivos en el tejido de la planta, se inocularon pistilos con exceso de cultivo de la estirpe a analizar y se recogieron de 24 a 48 horas después de la inoculación. Luego se colocaron sobre un portaobjetos, se cubrieron con agua y se tiñeron con calcoflúor a una concentración final de 0,2 mg/ml. De esta manera se podían distinguir los filamentos que se encontraban sobre el tejido vegetal porque estaban teñidos con calcoflúor, de los filamentos que estaban dentro del tejido que no presentaban tinción.

7.4 Observación de microtúbulos

Para la observación de los microtúbulos se utilizaron estirpes que portaban el alelo *tub1-GFP* bajo la regulación del promotor constitutivo *Ptef1*. Por lo tanto, el patrón de tubulina se observó por fluorescencia GFP (*green fluorescent protein*)

8. Infección de plantas *Zea mays*

Para los ensayos de infección se utilizaron plantas de maíz variedad Gaspar Flint. Las plantas se crecieron en invernadero con temperatura entre 28°C-30°C, humedad entre 60-90% y fotoperíodo de 12 horas. Se infectaron aproximadamente catorce días después de haber sido sembradas mediante la inyección de cultivo (en el caso de estirpes diploides o solopatógenicas) o mezcla de cultivos compatibles (en el caso de estirpes haploides). Se inocularon alrededor de 10^7 células/ml en la base del tallo. A partir de los diez días se pudieron observar los síntomas característicos de la infección: clorosis, manchas de antocianina y tumores.

9. Germinación de teliosporas

Las teliosporas de los tumores se lavaron con 1,5% CuSO₄ durante 24 horas a temperatura ambiente con rotación suave. Luego se lavaron 6 veces con agua destilada estéril para eliminar la solución de esterilización y se sembraron en placas con el medio de cultivo adecuado.

10. Daño al ADN por tratamiento con luz UV

Para estudiar el control de daño a ADN se realizaron experimentos de sensibilidad a UV. Para ello se sembraron diluciones seriadas de las estirpes a estudiar y se sometieron a distintos pulsos de luz UV (0 J/m², 150 J/m² o 300 J/m²). Las placas se incubaron en estufa durante 48 horas y luego se analizó cualitativamente la viabilidad de las colonias.

11. Análisis *in silico* de las secuencias

La búsqueda de las proteínas Plk1, Bmh1, Srk1, Chk1 y Par1 de *Ustilago maydis* se hizo por similitud de secuencia usando el programa BLAST en el servidor de la base de datos de *U. maydis* (MUMDB; <http://mips.gsf.de/genre/proj/ustilago/>) utilizando como sonda las proteínas de *S. cerevisiae* o *S. pombe*.

Para analizar la identidad de secuencia se usó el programa BLAST del servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Los alineamientos de las proteínas se realizaron con el programa ClustalW.

El análisis de las secuencias, de los motivos de fosforilación de Plk1 y de los motivos de reconocimiento de Bmh1 se realizaron a través del servidor ELM (<http://www.elm.eu.org/>).

12. Construcción de las distintas estirpes de *U. maydis*

En este apartado se detallan las construcciones y la metodología general utilizadas para obtener las distintas estirpes de *U. maydis*. En el Anexo 1 se describen los oligonucleótidos utilizados en la Tabla 4.

12.1 Construcciones realizadas para la caracterización de Bmh1

Sustitución del promotor silvestre de *bmh1* por el promotor regulable *Pcrg1*

La construcción *bmh1^{crg1}* permitió sustituir el promotor de *bmh1* por el promotor regulable por fuente de carbono *Pcrg1*. Para intercambiar los promotores se amplificó un fragmento flanqueante a *bmh1* por la región 5' con los oligonucleótidos 1433-9 y 1433-10 y un fragmento que abarcaba el marco de lectura abierto más la región río abajo inmediata al fin del marco del lectura con los oligonucleótidos 1433-7 y 1433-11. El primero de los fragmentos se digirió con las enzimas *KpnI/EcoRI* mientras que el segundo con las enzimas *NdeI/KpnI*. Los fragmentos obtenidos se ligaron en el plásmido pRU11 digerido con *NdeI/EcoRI*. El plásmido resultante se denominó p1433crgNC y se digirió con *KpnI* para linealizarlo y transformar las estirpes pertinentes. Las estirpes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos 1433-1 y cbx2 (fragmento 1,2 kb) y *crg1* y 1433-4 (fragmento 2,15 kb) (Fig. 8).

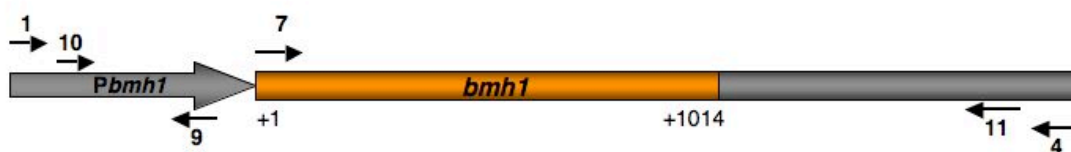


Figura 8. Esquema del gen *bmh1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Construcción y expresión del alelo *T7bmh1* bajo el promotor *Pcrg1*

Los mismos fragmentos anteriores se clonaron en el plásmido pRU11T7 que tiene el promotor *Pcrg1* fusionado al epítipo T7 de forma tal que el epítipo se introduce en el extremo amino terminal de la proteína. El plásmido

generado se digirió con *KpnI* para linealizarlo e integrarlo en el locus de *bmh1*. Las estirpes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos 1433-1 y *cbx2* (fragmento 1,2 kb) y *crg1* y 1433-4 (fragmento 2,15 kb).

Construcción y expresión el alelo *bmh1HA* bajo el promotor *Pbmh1*

Para estudiar la interacción entre Bmh1 y Cdc25 se construyó el alelo *bmh1HA*. Para ello se amplificó el gen *bmh1* con los oligonucleótidos 1433-7 y 1433-17 generando un fragmento de 1, 014 kb. El fragmento obtenido se clonó en el vector pBS-HA digerido con las enzimas *NdeI/EcoRI*. Este vector permite fusionar el epítipo HA en el extremo carboxilo terminal de las proteínas. El plásmido obtenido fue linealizado por digestión con la enzima *AatII* e integrado en el locus de *bmh1*. Los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos 1433-10 y *tag1* generando un fragmento de 2 kb en el caso de una correcta integración (Fig. 9).



Figura 9. Esquema del gen *bmh1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Expresión del alelo *bmh1RFP*

Para obtener una versión de Bmh1 que permitiera estudiar la localización de la proteína, se fusionó la proteína RFP (*red fluorescent protein*) al extremo carboxilo terminal de Bmh1. Para ello, se amplificó, por un lado, un fragmento correspondiente a casi todo el gen *bmh1* con la pareja de oligonucleótidos 1433-13 +1433-14 y otro fragmento flanqueante del gen por la región 3' con la pareja 1433-15 y 1433-16. Ambos fragmentos se digirieron con *SfiI* para ligarlos a un cassette que llevaba la proteína RFP y el gen de resistencia a tetraciclinas obtenido por digestión del plásmido pMF5-2n con la misma enzima. Con el producto de ligación se transformaron las diferentes estirpes. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos

1433-7 y rfp2 que amplificaron un fragmento de 2,2 kb en el caso de una correcta integración en el locus de *bmh1* (Fig. 10).



Figura 10. Esquema del gen *bmh1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.2 Construcciones realizadas para la caracterización de Cdc25

Construcción y expresión del alelo *cdc25-3GFP*

Para poder observar la localización de Cdc25 se construyó un alelo *cdc25* fusionado al gen *GFP* (*green fluorescent protein*) que se integró en el locus de *cdc25*. Para ello se amplificó un fragmento correspondiente al extremo 3' del gen *cdc25* y un fragmento flanqueante del gen por la región 3'. Ambos se digirieron con *SfiI* para ligarlos a un cassette que llevaba una triple GFP y el gen de resistencia a higromicina obtenido por digestión del plásmido pMF5-4h con la misma enzima. El fragmento correspondiente a la extremo 3' se amplificó con los oligonucleótidos *cdc25gfp2* y *cdc25gfp3*. El fragmento correspondiente a la región flanqueante 3' se amplificó con los oligonucleótidos *cdc25gfp4* y *cdc25gfp5*.

Con el producto de ligación se transformaron las diferentes estirpes. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos *cdc25gfp1* y *gfp1* que amplificaron un fragmento de 1,3 kb (Fig. 11).

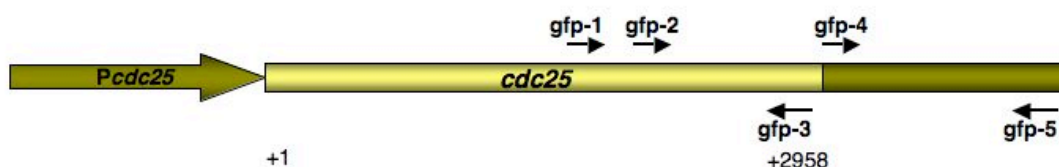


Figura 11. Esquema del gen *cdc25* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Construcción y expresión del alelo *cdc25^{AAA}* bajo el promotor *Pcdc25*

Para la obtención del alelo *cdc25^{AAA}*, que codificaba una versión no

fosforilable de Cdc25, se introdujeron sustituciones puntuales que permitieron el cambio de los aminoácidos serina de las posiciones 214 y 460 y treonina de la posición 584 por residuos de alanina. Estos cambios se incorporaron mediante PCR utilizando seis oligonucleótidos que a la vez creaban los sitios de restricción *Pf*MI, *Pst*I y *Xma*I respectivamente. De este modo se realizó una primer ronda de PCR con los oligonucleótidos cdc25-27 y cdc28-28, los oligonucleótidos cdc25-29 y cdc25-30 y los oligonucleótidos cdc25-31 y cdc25-32 generando las mutaciones ²¹⁴A, ⁴⁶⁰A y ⁵⁸⁴A respectivamente. Luego se amplificó el fragmento con las tres mutaciones utilizando los oligonucleótidos cdc25-34 y cdc25-36 (desde el nucleótido +321 al +3187. Paralelamente se generó un segundo fragmento que contenía toda la región promotora de *cdc25* y una pequeña región del extremo 5' de *cdc25* con los oligonucleótidos cdc25-33 y cdc25-35 (desde el nucleótido -3176 al +336). El primero de los fragmentos se digirió con las enzimas *Stu*I/*Eco*RI mientras que el segundo con las enzimas *Spe*I/*Stu*I. Ambos fragmentos se clonaron en el plásmido pCU2 digerido con *Spe*I/*Eco*RI. El plásmido resultante se denominó pCUpcdc25AAA y se digirió con *Ssp*I para integrarlo en el locus de la succinato deshidrogenasa. Los transformantes se analizaron por PCR con los oligonucleótidos cdc25-24 y cbx2 obteniéndose un fragmento de 3,4 kb. Los fragmentos de PCR fueron digeridos con *Pf*MI, *Pst*I y *Xma*I para comprobar que llevaban las mutaciones S214A, S460A y T584A (la digestión con *Pf*MI y *Pst*I generó tres fragmentos: 2,1 kb, 0,7 kb y 0,6 kb y la digestión con *Xma*I generó dos fragmentos cada uno de 1,7 kb).

También se generó un plásmido que llevaba una versión sin mutaciones de *cdc25*. Para ellos se amplificaron dos fragmentos, uno con los oligonucleótidos cdc25-34 y cdc25-36 (correspondientes a casi todo el gen *cdc25*) y otro con los oligonucleótidos cdc25-33 y cdc25-35 que correspondía a la región promotora más el extremo 5' del gen. Ambos fragmentos se ligaron en el plásmido pCU2 digerido con *Spe*I/*Eco*RI. El plásmido obtenido se denominó pcdc25control y se digirió con *Ssp*I para integrarlo en el locus de la succinato deshidrogenasa. El chequeo por PCR se realizó de la misma manera que para la versión mutada (Fig. 12).

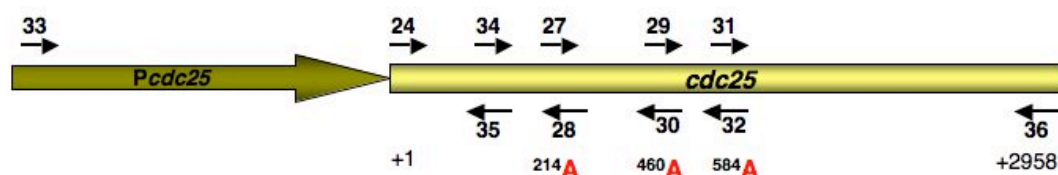


Figura 12. Esquema del gen *cdc25* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Expresión del alelo *cdc25^{AAA}myc* bajo el promotor *Pcrg1*

Para estudiar la interacción entre Bmh1 y Cdc25 se construyó el alelo *cdc25^{AAA}myc* que se colocó bajo el promotor *Pcrg1*. Para ello, se amplificó un fragmento que contenía todo el gen *cdc25* con las tres mutaciones utilizando como molde el plásmido pCUpcdc25AAA y los oligonucleótidos *cdc25-24* y *cdc25-2*. El fragmento se digirió con las enzimas *NdeI/EcoRI* y fue intercambiado por el fragmento *cdc25myc* del vector pRU11cdc25myc. El plásmido fue linealizado con la enzima *SspI* e integrado en el locus de la succinato deshidrogenasa. Los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos *crg1* y *tag1* generando un fragmento de 3,1 kb en el caso de una correcta integración. Luego se chequearon las mutaciones introducidas por digestión con las enzimas *PfMI*, *PstI* y *XmaI* como se detalló anteriormente (Fig. 13).

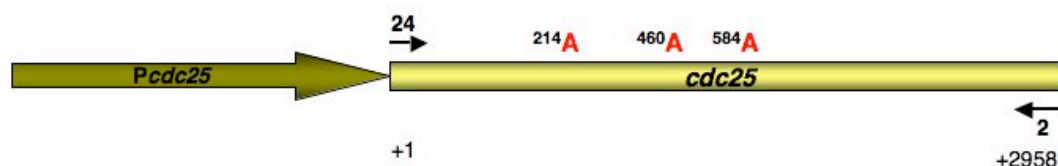


Figura 13. Esquema del gen *cdc25* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.3 Construcciones realizadas para la caracterización de Chk1

Deleción del gen *chk1*

Para construir la estirpe con pérdida de función se realizó la deleción por reemplazo homólogo siguiendo los protocolos de Kämper (2004) y Brachmann *et al.* (2004). Para ello se amplificaron dos fragmentos flanqueantes del gen *chk1* y se digirieron con la enzima de restricción *SfiI* para ligarlos posteriormente al gen que confiere resistencia a carboxina obtenido por

digestión del plásmido pUMa260 con la misma enzima. El fragmento correspondiente a la región homóloga 5' se amplificó con los oligonucleótidos chk1-2 y chk1-3. El fragmento correspondiente a la región homóloga 3' se amplificó con los oligonucleótidos chk1-7 y chk1-8. A continuación se transformaron las diferentes estirpes con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos chk1-1 y cbx1 para el extremo 5' y chk1-9d y cbx2 para el extremo 3'. Estas PCR rindieron fragmentos de 1,25 kb y de 2,15 kb respectivamente en el caso de una correcta substitución y no rindieron producto en caso contrario (Fig. 14).

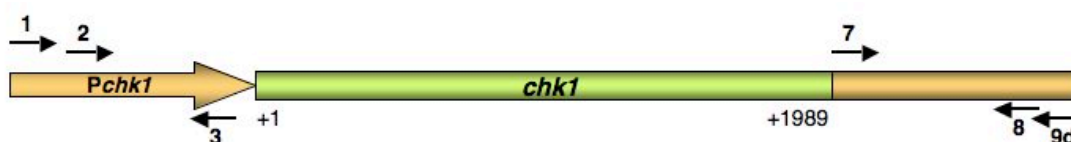


Figura 14. Esquema del gen *chk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.4 Construcciones realizadas para la caracterización de *Srk1*

Deleción del gen *srk1*

Se construyó una estirpe con pérdida de función siguiendo la estrategia descrita anteriormente utilizando carboxina como marcador de selección. El gen que confiere resistencia se obtuvo por digestión del plásmido pUMa260 con la enzima *Sfi*I. El fragmento correspondiente a la región homóloga 5' se amplificó con los oligonucleótidos srk1-2 y srk1-3. El fragmento correspondiente a la región 3' se amplificó con los oligonucleótidos srk1-4 y srk1-5. Se transformó *U. maydis* con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos srk1-1 y cbx1 para el extremo 5' (fragmento de 1,1 kb) y srk1-6 y cbx2 para el extremo 3' (fragmento de 1,6 kb) (Fig. 15).



Figura 15. Esquema del gen *srk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.5 Construcciones realizadas para la caracterización de Par1

Deleción del gen *par1*

Para la obtención del alelo $\Delta par1$ se siguió la misma estrategia descrita anteriormente utilizando carboxina como marcador de selección. El fragmento de la región homóloga 5' se generó con los oligonucleótidos par1-2 y par1-3 que amplifican un fragmento de 1 kb. Se amplificó otro fragmento de 1 kb correspondiente a la región homóloga 3' con los oligonucleótidos par1-4 y par1-5. La transformación se realizó con el producto de ligación de los tres fragmentos descritos y chequeó por PCR con los oligonucleótidos par-1 y cbx1 para el extremo 5' (fragmento de 1,2 kb) y par1-6 y cbx2 para el extremo 3' (fragmento de 1,25 kb) (Fig. 16).

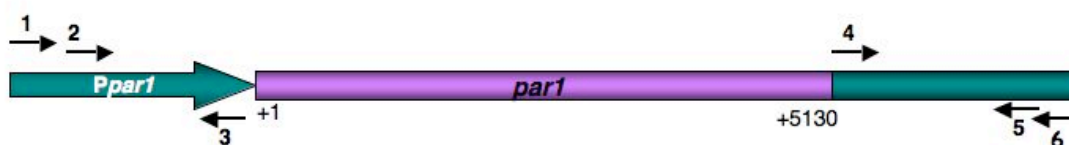


Figura 16. Esquema del gen *par1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.6 Construcciones realizadas para la caracterización de Plk1

Deleción del gen *plk1*

Para construir la estirpe con pérdida de función se siguió la estrategia descrita anteriormente. Para ello se amplificaron dos fragmentos flanqueantes del gen *plk1* y se digirieron con la enzima de restricción *SfiI* para ligarlos posteriormente al gen que confiere resistencia a higromicina obtenido por digestión del plásmido pUMa261 con la misma enzima. El fragmento correspondiente a la región homóloga 5' se amplificó con los oligonucleótidos plk1-4 y plk1-5. El fragmento correspondiente a la región homóloga 3' se amplificó con los oligonucleótidos plk1-7 y plk1-8. A continuación se transformaron las diferentes estirpes con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos plk1-6 y smut3 para el extremo 5' y plk1-9 y smut1 para el extremo 3'. Estas PCR rindieron fragmentos de 0,98 kb y de 1,81 kb respectivamente en el caso

de una correcta substitución y no rindieron producto en caso contrario (Fig. 17).



Figura 17. Esquema del gen *plk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Sustitución del promotor silvestre *Pplk1* por el promotor regulable *Pnar1*

La construcción *plk1^{nar1}* permitió sustituir el promotor de *plk1* por el promotor regulable por fuente de nitrógeno *Pnar1*. Para intercambiar los promotores se amplificó un fragmento flanqueante al gen por la región 5' con los oligonucleótidos *plk1*-6 y *plk1*-10 y un fragmento correspondiente al extremo 5' del gen con los oligonucleótidos *plk1*-3 y *plk1*-11b. El primero de los fragmentos se digirió con las enzimas *KpnI/EcoRI* mientras que el segundo con las enzimas *NdeI/KpnI*. Con los fragmentos obtenidos se realizó una ligación tripartita sobre el vector *pRU2* digerido con *NdeI/EcoRI*. El plásmido resultante se denominó *pnarplk1CBX* y se digirió con *KpnI* para linealizarlo y transformar las estirpes pertinentes. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos *plk1*-15+*cbx2* (fragmento 1,32 kb) y *nar1*+ *plk1*-12 (fragmento 2,02 kb).

Se realizó la misma construcción sobre el plásmido *pRU2hyg* que confiere resistencia a la higromicina, obteniéndose el plásmido *pnarplk1HYG*. En este caso los transformantes se chequearon con los oligonucleótidos *nar1*+*plk1*-12 y *smut1*+*plk1*-15 que generaron fragmentos de 2,02 kb y 3,9 kb respectivamente (Fig. 18).

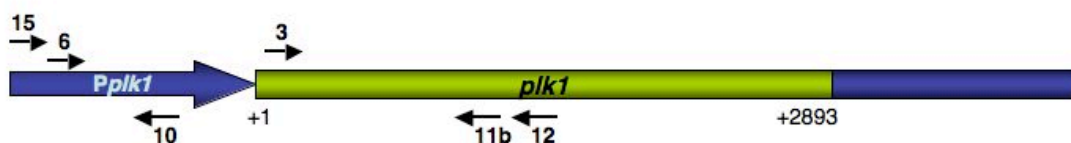


Figura 18. Esquema del gen *plk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Sustitución del promotor silvestre de *plk1* por el promotor constitutivo *Ptef1*

La construcción *plk1^{tef1}* permitió sustituir el promotor *Pplk1* por el promotor constitutivo del factor de elongación de la transcripción *Ptef1*. Para realizarla se digirió el plásmido pRU2plk1CBX con las enzimas *NdeI/EcoRI* liberando un fragmento de 1,74kb correspondiente a la región del promotor *Pplk1* ligado al extremo 5' del gen *plk1*. Este fragmento se clonó en el plásmido pCU3 que confiere resistencia a la carboxina. El plásmido resultante se denominó ptefplk1 y se digirió con *KpnI* para linealizarlo y transformar las estirpes pertinentes. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos plk1-15 y cbx2 (fragmento 1,32 kb) y tef1 + plk1-12 (fragmento 1,93 kb).

Se realizó la misma construcción sobre un plásmido que confiere resistencia a la higromicina. En este caso el plásmido se denominó ptefplkHYG y los transformantes se chequearon con tef1+plk1-12 y smut3+plk1-15 que rindieron fragmentos de 1,93 kb y 1,2 kb respectivamente.

Construcción del alelo *plk1HA* y expresión bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*

Para la construcción del alelo *plk1HA* se usó el plásmido pGNB-HA que permite realizar fusiones al epítipo HA en el extremo carboxilo terminal. Para ello el gen *plk1* fue amplificado por PCR en dos fragmentos solapantes. Usando la pareja de oligonucleótidos plk1-3 y plk1-12 se amplificó desde el nucleótido +1 al nucleótido +1732 y se clonó en el plásmido pGEMT-E obteniendo el vector p-plk1C. En paralelo usando la pareja plk1-13 y plk1-14 se amplificó desde el nucleótido +1604 al +2896 y se clonó en el plásmido pGNB-HA obteniéndose el vector pGNB-plk1DHA. Posteriormente se digirió el plásmido p-plk1C con las enzimas *NdeI/EcoRI*, liberando un fragmento de 1,7 kb correspondiente al extremo 5' de *plk1*; a su vez el plásmido pGNB-plk1DHA fue digerido con las enzimas *MluI/AflI* liberando un fragmento de 1,33 kb que codifica el extremo carboxilo de Plk1 fusionado al epítipo HA. Estos fragmentos se mezclaron en una ligación tripartita con el vector pRU11 previamente digerido con las enzimas *NdeI/AflI*. El plásmido resultante, denominado pRU11plk1HA,

codificaba para una proteína Plk1 fusionada a HA bajo el promotor regulable *Pcrg1* y dirige la integración hacia el locus de la succinato deshidrogenasa. El plásmido pRU11plk1HA se linealizó por digestión con *Sspl* antes de transformar las estirpes de *U. maydis*. Los transformantes se chequearon por PCR usando la pareja de oligos crg1+tag1 que rindieron un fragmento de 3 kb sólo en el caso de una correcta integración (Fig. 19).

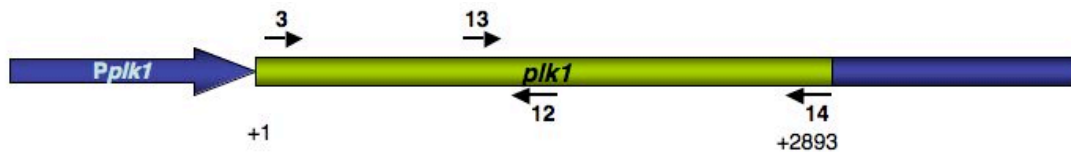


Figura 19. Esquema del gen *plk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Construcción de alelo *T7polo* y expresión bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*

Para la expresión regulada del dominio polo se escogió el promotor *Pcrg1*. Para ello se amplificó la región correspondiente al dominio polo con los oligonucleótidos plk1-27 y plk1-28 y se digirió con las enzimas *Bam*HI/*Bs*WI. El fragmento obtenido se clonó en el vector pRU11T7 que contiene el promotor *Pcrg1* fusionado al epítipo T7, de forma tal que el epítipo se introduce en el extremo amino terminal. El plásmido resultante se denominó pT7polobox y se linealizó con *Sspl* para integrarlo en el locus de la succinato deshidrogenasa. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos crg1 y cbx2 (fragmento 2,45 kb) (Fig. 20).

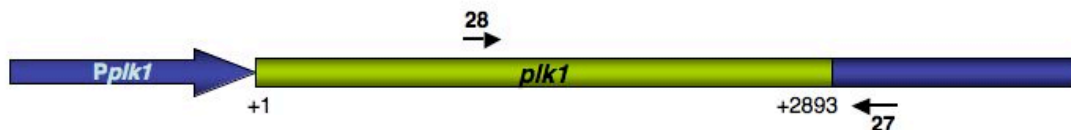


Figura 20. Esquema del gen *plk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Expresión de la proteína GFP fusionada a una señal de localización nuclear bajo el promotor *Pplk1*

Para poder estudiar la regulación de la expresión de *plk1*, se colocó la proteína GFP fusionada a una señal de localización nuclear bajo la regulación del promotor *Pplk1*. Para ello se amplificó un fragmento que abarcaba la región promotora de *plk1* con los oligonucleótidos plk1-17 y plk1-22 (consideramos región promotora toda la región intergénica). Este fragmento poseía las dianas *KpnI/NcoI*. Para clonarlo en el vector pMS76 (que contenía la señal de localización nuclear fusionada a una triple GFP) entre las dianas *XbaI/NcoI* se realizó una digestión secuencial. Primero se realizaron las digestiones con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, luego se hicieron romos los extremos del fragmento y del vector y finalmente se realizó la digestión con la enzima *NcoI*. Los productos obtenidos se ligaron generando el plásmido ppromotorGFP que fue digerido con la enzima *SspI* para su integración en el locus de la succinato deshidrogenasa. Las estirpes se chequearon con los oligonucleótidos plk1-21 y gfp1 (fragmentos de 1,8 kb, 1,09 kb y 0,42 kb) (Fig. 21).

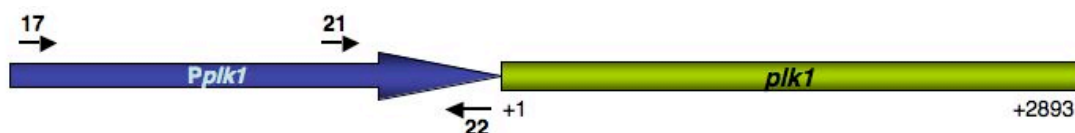


Figura 21. Esquema del gen *plk1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Expresión de los alelos *cdk1myc* y *cdk1^{AF}myc* bajo el promotor heterólogo *Pcrg1*.

Para expresar el alelo *cdk1myc* desde el promotor regulable por fuente de carbono *Pcrg1* se usó el plásmido pCU3cdk1-myc. Este vector se digirió con las enzimas *NdeI/AflI* liberando el fragmento cdk1myc de 1,1 kb que se transfirió al vector pRU11 generando el plásmido pRU11cdk1myc. Este último se digirió con *SspI* para linealizarlo e integrarlo al locus de la succinato deshidrogenasa. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos crg1 y tag1 que amplificaron un fragmento de 1,3 kb.

De forma análoga partiendo de la construcción pCU3cdk1AFmyc se construyó

el plásmido pRU11cdk1AFmyc.

12.7 Construcciones realizadas para la caracterización de Hsl1

Deleción del gen *hsl1*

Para la deleción de *hsl1* se siguió la misma estrategia descrita para las deleciones anteriores utilizando higromicina como marcador de selección. El fragmento correspondiente a la región homóloga 5' se amplificó con los oligonucleótidos hsl1-16 y hsl1-15. El fragmento correspondiente a la región homóloga 3' se amplificó con los oligonucleótidos hsl1-6 y hsl1-7. Se transformaron las diferentes estirpes con el fragmento resultante de la ligación. Los transformantes se chequearon por PCR utilizando los oligonucleótidos hsl1-17 y smut3 para el extremo 5' (fragmento de 1 kb) y hsl1-8 y smut1 para el extremo 3' (fragmento de 2 kb) (Fig. 22).



Figura 22. Esquema del gen *hsl1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

Construcción y expresión del alelo *hsl1HA*

Para generar el alelo *hsl1HA* se utilizó el plásmido pGNB-HA que permite realizar fusiones al epítipo HA en el extremo carboxilo terminal. Se amplificó el marco de lectura abierto de *hsl1* (que se extiende desde el nucleótido +1 al nucleótido +3816) usando los oligonucleótidos hsl1-14 y hsl1-5. El fragmento obtenido se clonó como *NdeI/MfeI* en el plásmido pGNB-HA generando el plásmido pGNB- hsl1HA. Luego se digirió este vector con las enzimas *NdeI/AflII* y el fragmento hsl1HA fue transferido al plásmido pRU2. El plásmido resultante pnar-Hsl1-HA, que codificaba para una proteína Hsl1 fusionada a HA bajo el promotor regulable *Pnar1*, se linealizó con *SspI* para integrarlo en el locus de la succinato deshidrogenasa. Los transformantes se chequearon por PCR con los oligonucleótidos nar1 y tag1 que amplificaron un fragmento de 4

kb (Fig. 23).

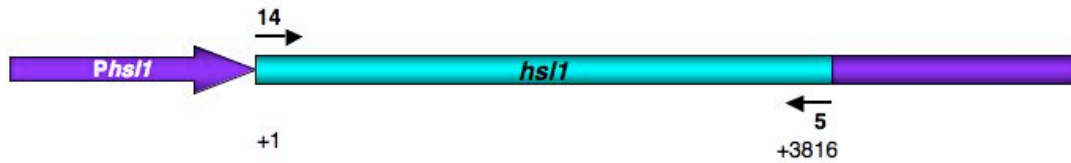


Figura 23. Esquema del gen *hsl1* con la ubicación relativa de los oligonucleótidos

12.8 Construcciones realizadas para la caracterización de Clb1

Sustitución del promotor silvestre de *clb1* por el promotor constitutivo *P_{tef1}*

Para expresar el alelo *clb1* bajo el promotor constitutivo *P_{tef1}* con el marcador de selección higromicina se usaron los plásmidos pCU3clb1 (que posee la construcción *clb1^{tef1}* con el gen de resistencia a la carboxina) y pGEMHyg (de donde se obtuvo el gen de resistencia a higromicina). Se intercambiaron los genes de resistencia digiriendo con las enzimas *HindIII/EcoRI*. Se generó el plásmido pclb1tefhyg que se linealizó con la enzima *KpnI* para transformar las estirpes pertinentes. Los transformantes se chequeron por PCR con los oligonucleótidos *tef1* y *yclb1Bamh1* que amplificaron un fragmento de 2,2 kb en el caso de una correcta integración en el locus de *clb1*.

Resultados

La parada del ciclo celular en el
filamento infectivo

Capítulo I

1. La parada de ciclo

1.1 Las estirpes AB31 y AB33 mimetizan la formación del filamento infectivo

Para estudiar la parada del ciclo celular que ocurre en el filamento infectivo utilizamos las estirpes haploides AB31/32/33/34 (Brachmann *et al.*, 2001) en las que se puede inducir la expresión de las proteínas b y por lo tanto la formación del filamento infectivo.

La estirpe AB33 posee los alelos compatibles que codifican para las proteínas b que forman el heterodímero bW1/bE2 bajo la regulación del promotor *Pnar1*. Por lo tanto, en medio mínimo con nitrato se induce la formación del filamento infectivo que presenta un núcleo. Mientras que en medio mínimo con amonio, CM o YP el promotor *Pnar1* está reprimido y las células crecen como levaduras. La estirpe AB34 posee una construcción análoga pero con una pareja de alelos b no compatibles (*bW2* y *bE2*), por lo tanto no forma el heterodímero b y no induce la formación del filamento infectivo en medio inductor (Fig. 24).

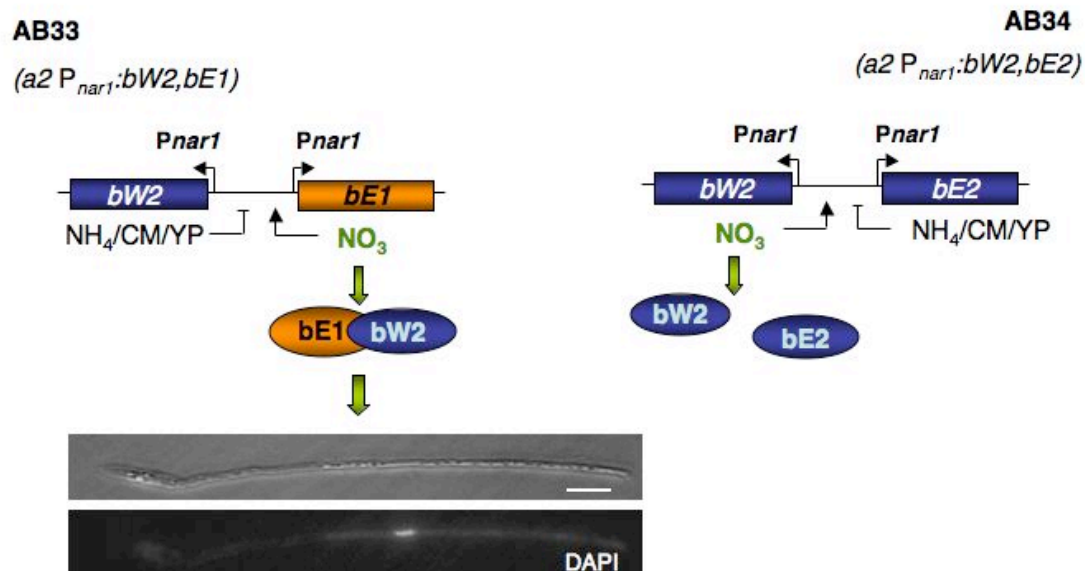


Figura 24. Esquema de la organización del locus b en las estirpes AB33 y AB34. Los genes b están bajo la regulación del promotor *Pnar1* inducible en MMNO₃ y reprimible en MMNH₄, CM o YP. La estirpe AB33 posee genes de alelos compatibles que forman el heterodímero b que induce la formación del filamento infectivo con un núcleo. La estirpe AB34 posee genes del mismo alelo que no forman el factor de transcripción. Barra: 10 µm.

Las estirpes AB31 y AB32 simulan este mismo proceso, en este caso la expresión de los genes del *locus b* está bajo la regulación del promotor *Pcrg1*. En la estirpe AB31 se induce la formación del filamento infectivo en medios con arabinosa, mientras que en la estirpe AB32 no hay formación del filamento.

1.2 La parada del ciclo celular ocurre en G2 y es dependiente del heterodímero b

En primer lugar, analizamos en qué fase del ciclo celular ocurre la parada. Para ello, observamos la morfología, los núcleos, el contenido de ADN así como la disposición de la tubulina en las estirpes AB33 y AB34. Como se muestra en la Figura 25 A, tras 6 horas en medio inductor de las proteínas b, en la estirpe AB33 se observaron filamentos infectivos con un núcleo. El patrón de polimerización de la tubulina y el hecho de que se acumularan filamentos con contenido de ADN 2C indicaban que el ciclo celular estaba detenido en G2. Mientras que en medio CMD no se observó la formación de filamentos infectivos ni parada del ciclo celular (Fig. 25A). Esto mismo ocurrió con la estirpe AB34 cuando fue cultivada tanto en medio inductor como represor (Fig. 25B) indicando que la parada del ciclo dependía del heterodímero b.

A

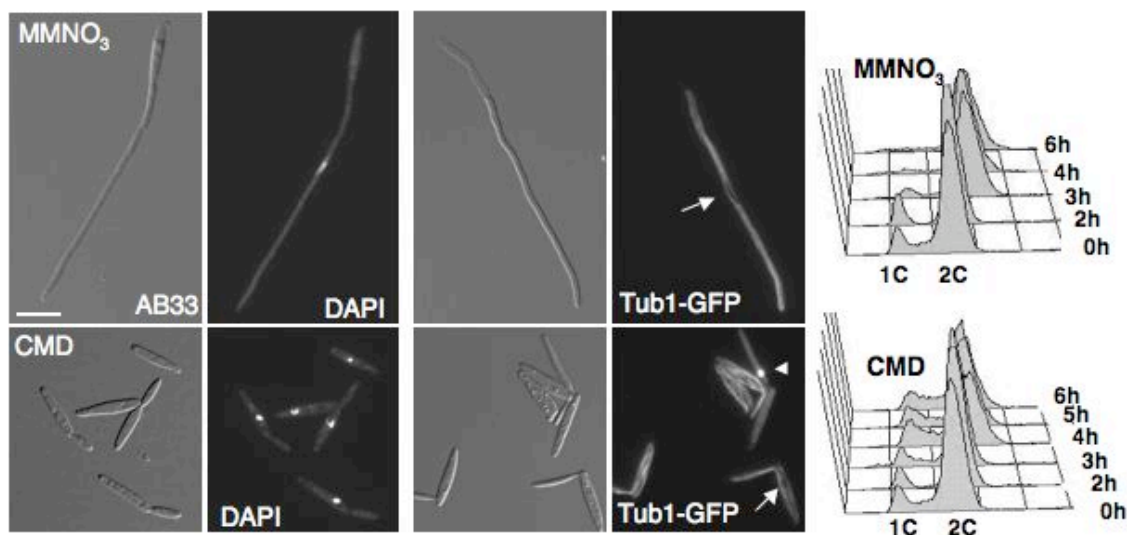


Figura 25. La inducción de las proteínas b detiene el ciclo en G2. A. Ver texto en la siguiente página.

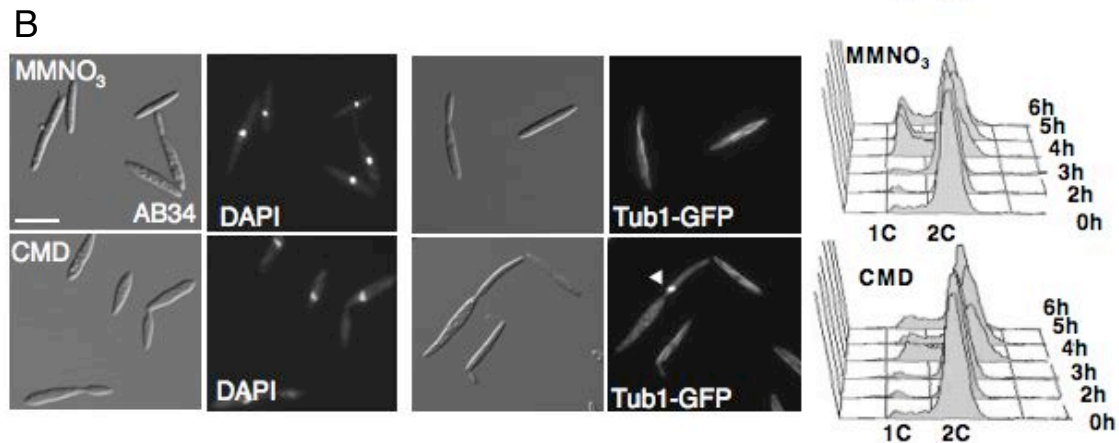


Figura 25. La inducción de las proteínas b detiene el ciclo en G2. A. Fenotipo de la estirpe AB33 tras 6 horas en medio inductor (MMNO_3) y en medio represor (CMD). **B.** Fenotipo de la estirpe AB34 tras 6 horas en medio inductor y represor de las proteínas b. En ambas figuras los núcleos se tiñeron con DAPI y los microtúbulos se observaron por fluorescencia. La flecha indica un patrón de tubulina característico de G2 mientras que la punta de flecha indica microtúbulos formando el cuerpo polar. Se observó el contenido de ADN por FACS. Barra: 10 μm .

1.3 Los niveles de proteína Clb1 y de mensajero caen cuando se forma el heterodímero b, mientras que los de Clb2 y Cdk1 no se modifican

Considerando que la parada del ciclo celular ocurre en la fase G2, decidimos estudiar los principales reguladores de la transición G2/M, las ciclinas Clb1 y Clb2 y la quinasa Cdk1 (García-Muse *et al.*, 2004). Analizamos los niveles de las ciclinas y de Cdk1 al inducir la formación del filamento infectivo en las estirpes AB33 *clb1myc*, AB34 *clb1myc*, AB33 *clb2myc* y AB34 *clb2myc*. Como se observa en la Figura 26, los niveles de proteína Clb1 disminuyeron luego de transferir la estirpe AB33 *clb1myc* a medio inductor. Por otra parte, los niveles de proteína Clb2 y Cdk1 no se modificaron.

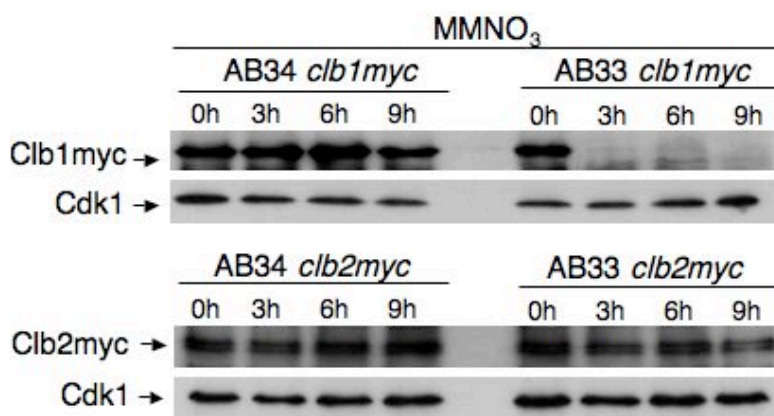


Figura 26. Análisis por Western blot de los niveles de las ciclinas Clb1 y Clb2 cuando se induce la formación del filamento infectivo. En el control de carga se observa que los niveles de Cdk1 no se modifican.

Considerando estos resultados y el hecho de que el heterodímero b es un factor de transcripción decidimos estudiar si la caída de los niveles de proteína Clb1 era una consecuencia de la regulación de los niveles de ARNm. En la Figura 27 se muestra que la expresión de *clb1* disminuyó luego de la inducción de la formación del filamento infectivo, indicando que la caída de Clb1 se debía a la disminución de los niveles de mensajero.

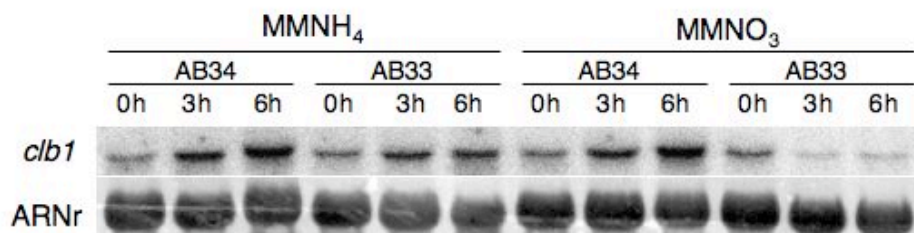


Figura 27. Los niveles de *clb1* caen al inducir la formación el filamento infectivo. Análisis de la expresión de *clb1* por Northern blot. Las estirpes AB33 y AB34 se crecieron en CMD (medio represor, el tiempo 0h se tomó en este medio), luego se lavaron y se transfirieron a MMNH₄ (medio represor) y MMNO₃ (medio inductor). Se tomaron muestras cada tres horas.

1.4 La caída de los niveles de *clb1* no explica totalmente la parada del ciclo celular

Como Clb1 es una ciclina esencial para el paso G2/M del ciclo celular de *U. maydis* (García-Muse, *et al.*, 2004), decidimos estudiar si la disminución de los niveles de *clb1* estaba implicada en la parada de ciclo inducida por el heterodímero b. Para ello se analizó el efecto de la expresión heteróloga de *clb1* en la estirpe AB33 reemplazando el promotor de *clb1* por el promotor constitutivo *Ptef1* generando la estirpe MUM46. Cuando analizamos los filamentos producidos por esta estirpe, se observó un 23% de filamentos con 2 núcleos (Fig. 28). Estos resultados sugerían que si bien la regulación de *clb1* podría estar involucrada, al menos otro mecanismo debería estar implicado en la parada de ciclo.

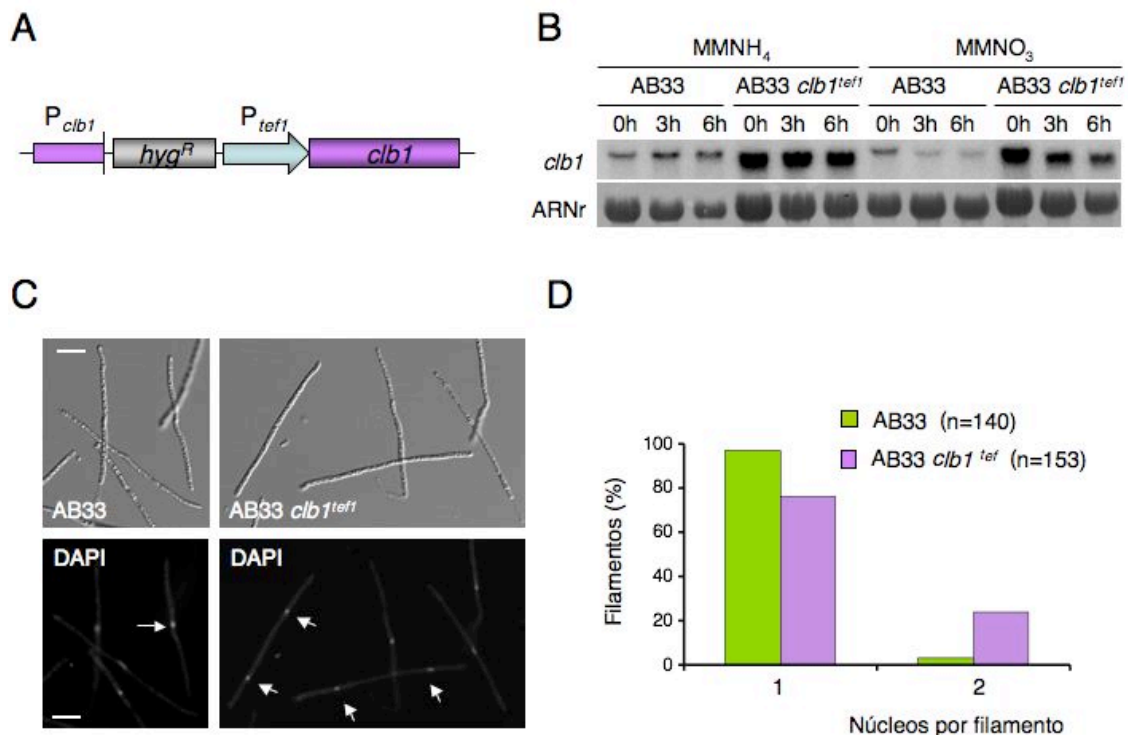


Figura 28. La caída de *clb1* no explica la parada de ciclo. **A.** Esquema de la sustitución del promotor de *clb1* por el promotor *P_{tef1}*. **B.** Análisis por Northern blot del ARNm de *clb1* en las estirpes AB33 y AB33 *clb1^{tef1}*. Las células se crecieron en CMD (tiempo 0h) y luego se transfirieron a los medios mínimos con las distintas fuentes de nitrógeno y se tomaron muestras cada 3 horas. **C.** Filamentos tras 24 horas en medio inductor. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Las flechas indican los núcleos. Barra: 10 μ m. **D.** Cuantificación de filamentos con 1 núcleo y con 2 núcleos. Se observaron 140 filamentos de la estirpe AB33 (color verde) y 153 filamentos de la estirpe AB33 *clb1^{tef1}* (color rosado).

1.5 La parada de ciclo inducida por el heterodímero b depende del estado de fosforilación de Cdk1

La fosforilación de la quinasa Cdk1 es otro punto importante en el control del paso G2/M. En *U. maydis* la fosforilación inhibitoria de Cdk1 produce la inhibición de la entrada a mitosis mientras que la reversión de la fosforilación permite la entrada a mitosis. La quinasa Wee1 y la fosfatasa Cdc25 son los posibles reguladores de este proceso (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b). Para analizar si la fosforilación sobre la proteína Cdk1 estaba implicada en la parada de ciclo inducida por el heterodímero b, utilizamos el alelo *cdk1^{AF}myc*. Esta versión de la proteína no puede ser fosforilada e inhibida, provocando una entrada sin control en mitosis (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). Como el alelo silvestre no puede ser sustituido por el *cdk1^{AF}myc*, el alelo con las sustituciones

es integrado en el *locus* de la succinato deshidrogenada y expresado bajo un promotor heterólogo. En estas condiciones el alelo *cdk1^{AF}myc* presenta un efecto dominante (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). Se introdujo este alelo bajo la regulación del promotor *Pnar1* en la estirpe AB33 (UMC20) con el objetivo de inducir las proteínas b y la versión *cdk1^{AF}myc* simultáneamente. Tras 6 horas en medio inductor, la estirpe UMC20 presentaba más de un núcleo en todos los filamentos (Fig. 29).

Estos resultados indicaban que la fosforilación de Cdk1 era determinante en la parada de ciclo en G2 producida por la proteína b.

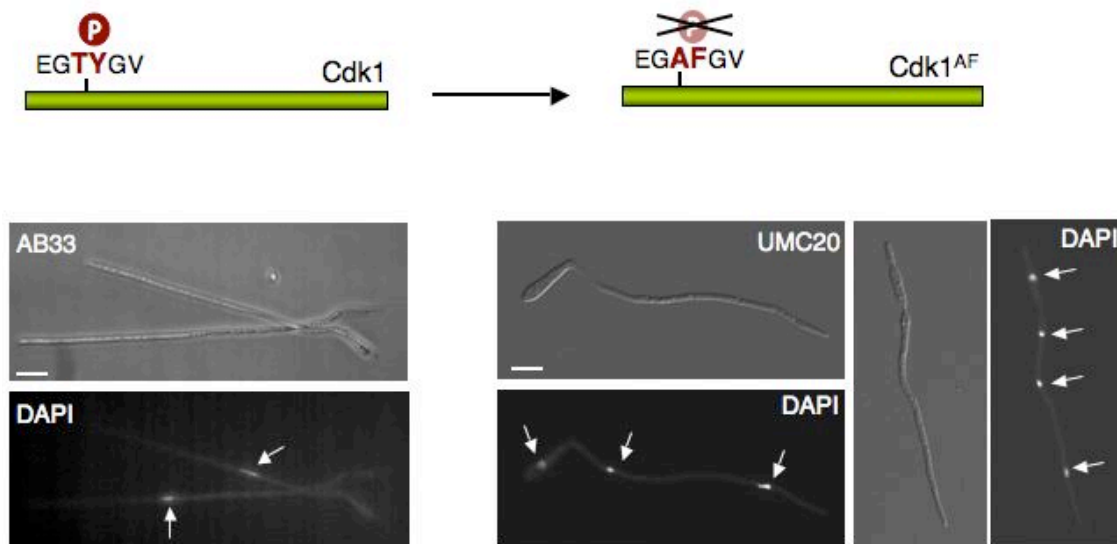


Figura 29. El ciclo celular no se detiene en la estirpe UMC20. Esquema indicando la sustitución realizada en la versión Cdk1^{AF}. En el panel de la izquierda se muestra la estirpe AB33 y en el panel de la derecha la estirpe UMC20 (AB33 *Pnar1cdk1^{AF}myc*) tras 6 horas en medio inductor. Ambas estirpes se crecieron en medio CMD, luego se lavaron y se transfirieron a medio inductor. Las flechas señalan los núcleos que se tiñeron con DAPI. Barra: 10 μ m.

1.6 La caída de los niveles de *clb1* depende de la parada del ciclo celular

Dado que Clb1 es requerida para el paso G2/M (García-Muse *et al.*, 2004) y que observamos que la transcripción de *clb1* caía tras la expresión del factor de transcripción b, nos pareció una contradicción que en presencia de la versión Cdk1^{AF} las células fueran capaces de progresar a mitosis. Una explicación posible para esta observación era que la caída de los niveles de ARNm de *clb1*

era una consecuencia de la parada de ciclo impuesta por la fosforilación inhibitoria de Cdk1. Para estudiar esta posibilidad analizamos los niveles de *clb1* en la estirpe UMC20. Como se observa en la Figura 30, los niveles de mensajero no disminuían en medio inductor indicando que la caída de los niveles *clb1* estaba asociada a la parada del ciclo celular.

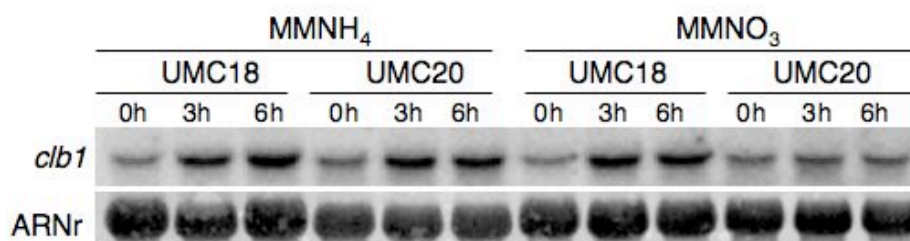


Figura 30. Los niveles de *clb1* no caen si el ciclo no se detiene. Análisis por Northern blot de los niveles de ARNm de *clb1* en las estirpes UMC18 (AB34 *Pnar1cdk1^{AF}myc*) y UMC20 (AB33 *Pnar1cdk1^{AF}myc*). Las células se crecieron en CMD (tiempo 0h), luego se transfirieron a los medios mínimos con las distintas fuentes de nitrógeno y se tomaron muestras cada 3 horas.

1.7 La parada del ciclo celular depende de la quinasa Wee1

Se ha descrito que la quinasa Wee1 está implicada en la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en un ciclo celular normal de *U. maydis* (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). Como la parada de ciclo inducida por el factor de transcripción b parecía estar relacionada con la fosforilación de Cdk1, analizamos el papel de la quinasa Wee1. Para ello utilizamos la estirpe AB31 donde la expresión de las proteínas b se induce por arabinosa y se reprime por glucosa. En este fondo genético se reemplazó el promotor de *wee1* por el promotor *Pnar1* generando la estirpe MUM62 (AB31 *wee1^{nar1}*). Tras 6 horas en CMA, donde se inducía la formación del filamento infectivo y se reprimía la expresión de *wee1^{nar1}*, todos los filamentos de la estirpe MUM62 presentaron más de un núcleo (Fig. 31).

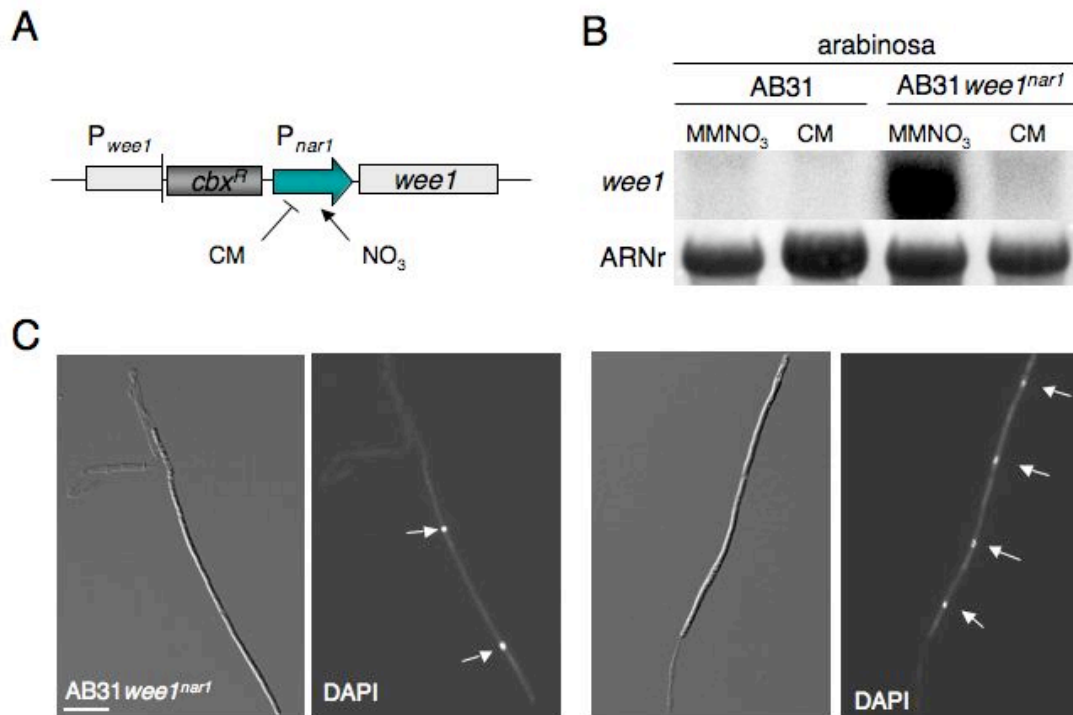


Figura 31. Cuando se reprime *wee1* no hay parada del ciclo celular en el filamento infeccioso. A. Esquema de la sustitución del promotor de *wee1* por el promotor *P_{nar1}*. **B.** Análisis de la expresión de *wee1* por Northern blot. Las estirpes se crecieron en arabinosa para inducir la formación del filamento infeccioso y en CM para reprimir la expresión de *wee1* en la estirpe AB31 *wee1^{nar1}*. **C.** La estirpe AB31 *wee1^{nar1}* se cultivó en CMA. Las flechas señalan los núcleos. Barra: 12 μm.

Estos resultados eran coherentes con los observados para la versión Cdk1^{AF} y sugerían que Wee1 era la quinasa implicada en este proceso. Sin embargo, estudios anteriores mostraron que si bien los niveles transcripcionales de *wee1* aumentaban levemente tras la inducción del heterodímero b, el cambio del promotor de *wee1* por un promotor heterólogo débil no afectaba totalmente la parada del ciclo celular (Sgarlata, 2005). Considerando estos resultados, analizamos el papel de Cdc25 en la parada de ciclo inducida por el heterodímero b.

1.8 La sobreexpresión de Cdc25 activa parcialmente el ciclo celular

La fosfatasa Cdc25 es la contrapartida de Wee1 en el ciclo celular de *U. maydis*, puesto que está implicada en la reversión de la fosforilación inhibitoria de Cdk1 (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 b). Por ello decidimos estudiar su papel en la parada de ciclo inducida por las proteínas b. Para ello analizamos el

efecto de la sobreexpresión de *cdc25* reemplazando el promotor de *cdc25* por el promotor *Pdik6* (Bohlmann *et al.*, 1994), que se induce fuerte y específicamente por las proteínas b, en la estirpe AB33. Tras 24 horas en medio inductor, observamos un 47% de filamentos con dos núcleos y un 11% con más de dos núcleos (Fig. 32).

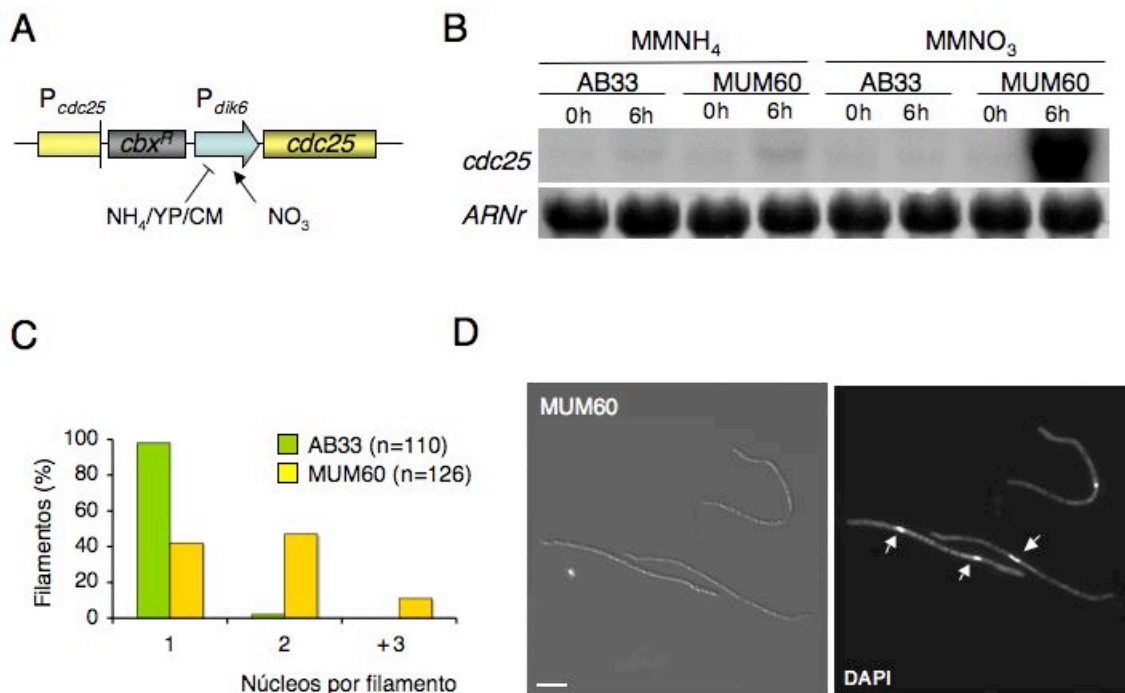


Figura 32. La sobreexpresión de *cdc25* activa el ciclo celular. **A.** Esquema de la sustitución del promotor de *cdc25* por el promotor *Pdik6*. **B.** Análisis del ARNm por Northern blot. Las estirpes AB33 y MUM60 (*AB33 Pdik6cdc25*) se cultivaron en medio represor (MMNH_4) e inductor (MMNO_3) durante 6 horas para tomar las muestras. **C.** Cuantificación de filamentos con 1 núcleo, 2 y más de 3 núcleos. Se observaron 110 filamentos de la estirpe AB33 (color verde) y 126 filamentos de la estirpe MUM60 (color amarillo). **D.** Fenotipo de la estirpe MUM60. Las flechas señalan los núcleos. Barra: 10 μm .

Por otra parte, estudios anteriores mostraron que los niveles transcripcionales de *cdc25* no se modificaban durante la inducción del filamento infeccioso (Sgarlata, 2005) sugiriendo que la regulación transcripcional no era determinante en la parada de ciclo inducida por el heterodímero b. Sin embargo, el hecho de que la sobreexpresión activara el ciclo podía deberse a que en esta situación se estuviera saturando algún represor de la fosfatasa.

2. Bmh1, un regulador negativo de Cdc25

2.1 Bmh1 es necesaria para la formación del filamento infectivo y la parada del ciclo celular

Las proteínas del tipo 14-3-3 son conocidos reguladores negativos de Cdc25, capaces de reconocer motivos fosforilados sobre la fosfatasa y de retenerla en el citoplasma retrasando el ciclo celular (Hermeking y Benzinger, 2006; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006; van Exuden y Steensma, 2006). Como la proteína Bmh1 de *U. maydis* está implicada en la regulación negativa de Cdc25 (Capítulo II, apartado 1.5), decidimos estudiar el papel de Bmh1 en la parada de ciclo inducida por las proteínas b.

Para ello se utilizó la estirpe MUM68 (AB33 *bmh1^{crg1}*) donde el promotor de *bmh1* fue sustituido por el promotor regulable por fuente de carbono *P_{crg1}* (Capítulo II, apartado 1). Se observó que tras 12 horas en CMD (tiempo en que se reprime *bmh1^{crg1}*), la estirpe MUM68 no formaba filamentos ni paraba el ciclo celular al ser transferida a medio inductor de las proteínas b (Fig. 33). Estos resultados indicaban que Bmh1 era necesaria en este proceso.

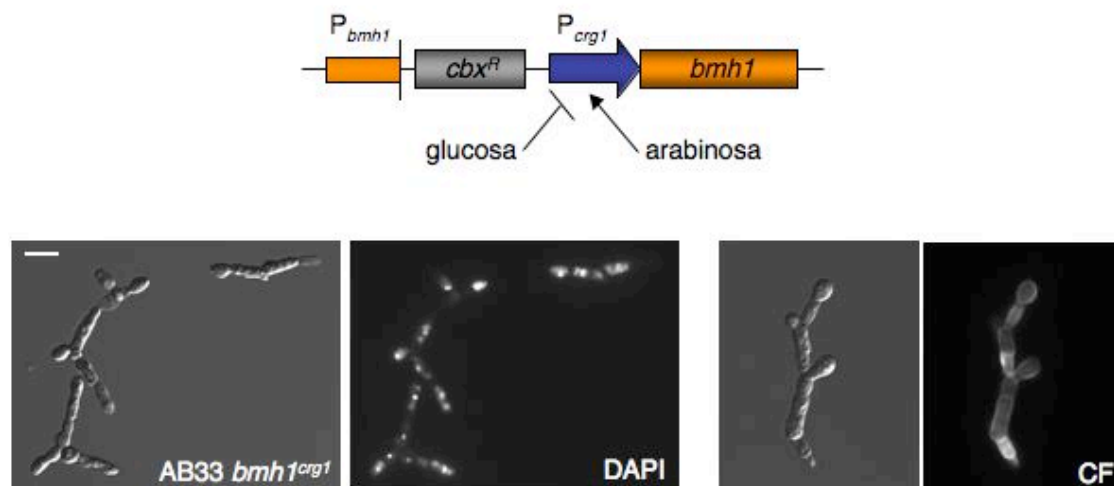


Figura 33. Bmh1 es necesaria para la inducción de la formación del filamento infectivo y la parada del ciclo celular. Esquema de la sustitución del promotor de *bmh1* por el promotor regulable por fuente de carbono *P_{crg1}*. Aspecto de las células de la estirpe AB33*bmh1^{crg1}*. Tras 10 horas en medio represor del promotor *P_{crg1}* (CMD) la estirpe se transfirió a medio inductor de las proteínas b. Los núcleos se observaron por DAPI y los septos con calcoflúor. Barra: 10 μm .

2.2 La versión Cdc25^{AAA} supera la parada del ciclo celular

Como Bmh1 podría regular a Cdc25 por el reconocimiento de motivos fosforilados, realizamos la sustitución en Cdc25 de tres residuos, posibles dianas para quinasas, por alaninas no fosforilables en putativos motivos de reconocimiento entre Bmh1-Cdc25. La versión Cdc25^{AAA} produjo una disminución en la interacción entre las proteínas y una entrada no regulada en mitosis (Capítulo II, apartado 1.5).

A continuación analizamos el comportamiento de la estirpe MUM57 (AB33 *cdc25^{AAA}*) donde el alelo *cdc25^{AAA}* fue colocado bajo la regulación del promotor *Pcdc25* e integrado en el *locus* de la succinato deshidrogenada y de la estirpe MUM58 (AB33 *cdc25*) donde se expresó el alelo silvestre *cdc25* en las mismas condiciones (Capítulo II, apartado 1.5). En medio inductor de las proteínas b, la estirpe MUM57 presentó un 31% de filamentos con dos núcleos tras 24 horas en medio inductor mientras que la estirpe MUM58, que expresaba el alelo silvestre, presentó filamentos con un núcleo (Fig. 34).

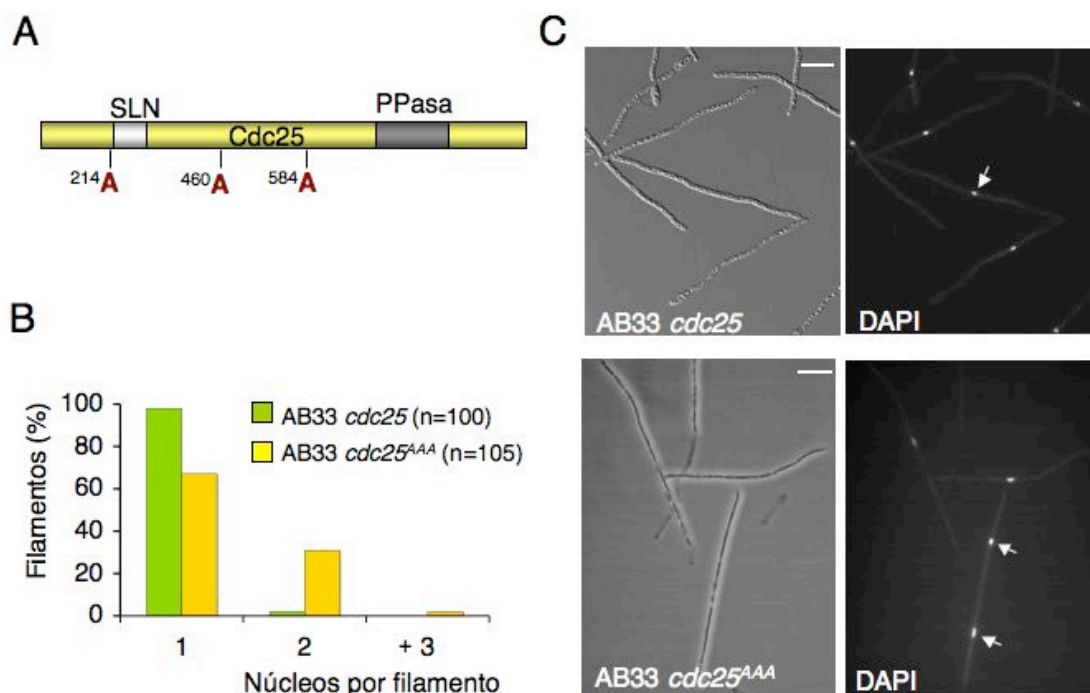


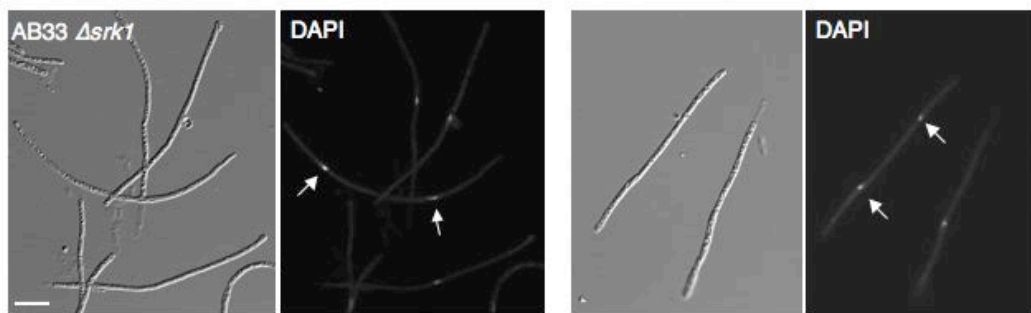
Figura 34. En la estirpe con la versión Cdc25^{AAA} se observan filamentos con más de un núcleo. A. Esquema de las sustituciones realizadas sobre Cdc25. **B.** Cuantificación de filamentos con 1 núcleo, 2 y más de 3 núcleos. Se observaron 100 filamentos de la estirpe AB33 *cdc25* (color verde) y 105 filamentos de la estirpe AB33 *cdc25^{AAA}* (color amarillo) tras 24 horas en medio inductor. **C.** Fenotipo de las estirpes. Las flechas señalan los núcleos. Barra: 10 μ m.

3. **Srk1, Chk1 y Par1, las posibles quinasas de Cdc25**

El siguiente paso fue estudiar el papel de quinasas que pudieran ser las responsables de la fosforilación de estos residuos, tales como *Srk1*, *Chk1* y *C-TAK1* (Peng *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998; López-Avilés *et al.*, 2005).

Hemos descrito que *U. maydis* posee una quinasa *Srk1* y una *Chk1* (Capítulo II, apartado 2). Para estudiar el efecto de *Srk1* se analizaron la morfología y los núcleos de los filamentos infectivos de la estirpe AB33 $\Delta srk1$. Observamos un 27% de filamentos con dos núcleos tras 24 horas en medio inductor (Fig. 35).

A



B

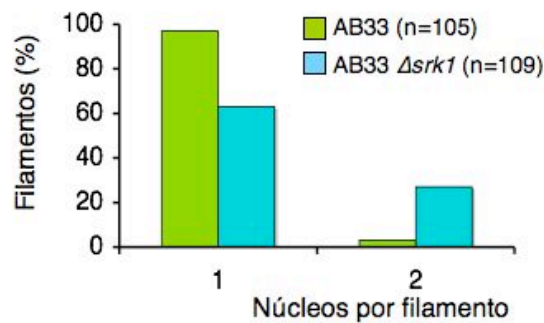


Figura 35. En la estirpe AB33 $\Delta srk1$ se observan filamentos con más de un núcleo. A. Fenotipo de la estirpe tras 24 horas en medio inductor. Las flechas señalan los núcleos. Barra: 10 μ m.. **B.** Cuantificación de filamentos con 1 núcleo y 2 núcleos. Se observaron 105 filamentos de la estirpe AB33 (color verde) y 109 filamentos de la estirpe AB33 $\Delta srk1$ (color celeste).

De forma análoga se analizaron la morfología y los núcleos de la estirpe UMP114 (*AB33 Δchk1*). Como se muestra en la figura, tras 7 horas en medio inductor la estirpe UMP114 presentaba filamentos infectivos con un núcleo y células deformadas con filamentos acortados o sin filamentos (Fig. 36A). Tras 26 horas en medio inductor también se observó un 20% de los filamentos con más de un núcleo (Fig. 36B). En medio represor las células eran indistinguibles de las silvestres.

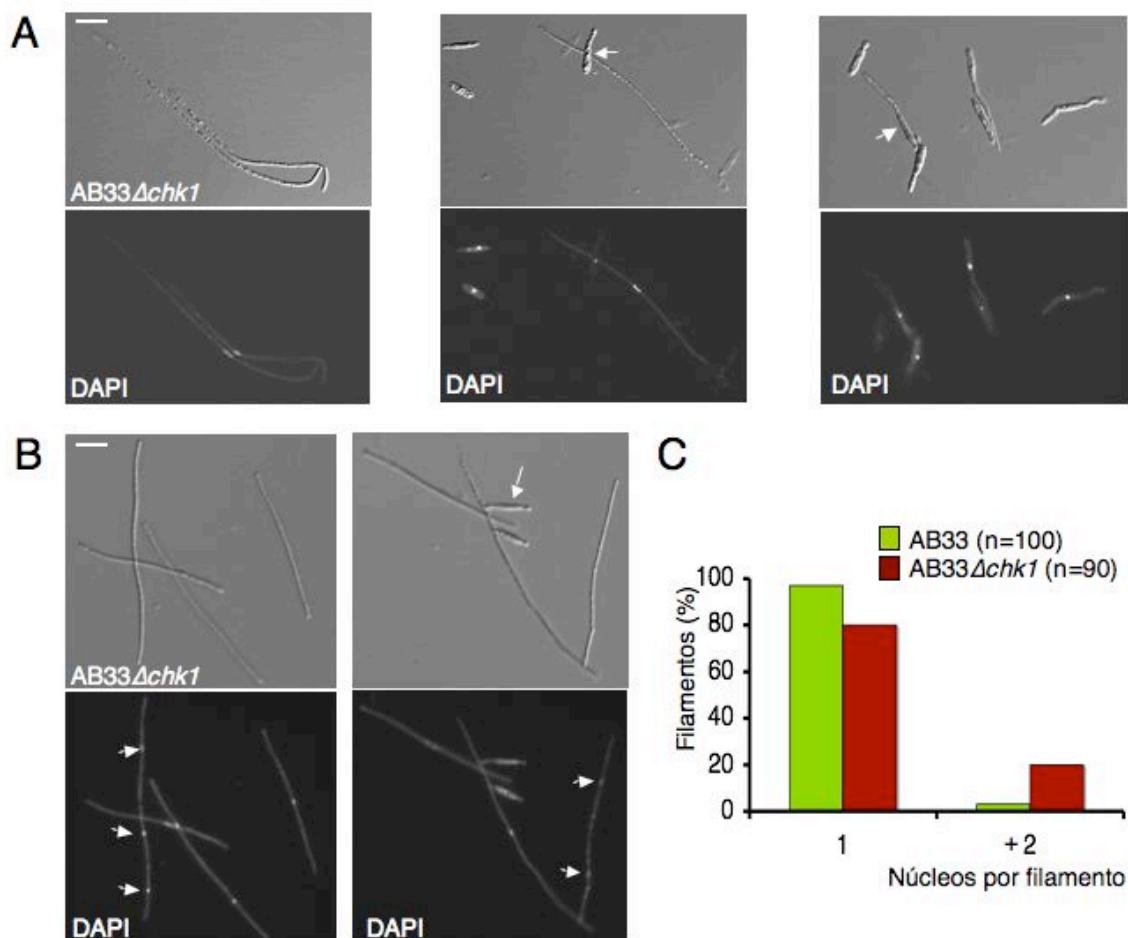


Figura 36. En la estirpe AB33 $\Delta chk1$ se observan filamentos con más de un núcleo.

A. Tras 7 horas en medio inductor se observaron filamentos y células no inducidas con morfología anormal (flechas). **B.** Tras 24 horas en medio inductor se observaron filamentos con más de un núcleo (flechas). En ambos paneles los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 10 μ m. **C.** Cuantificación de filamentos con 1 núcleo y 2 núcleos. Se observaron 100 filamentos de la estirpe AB33 (color verde) y 90 filamentos de la estirpe AB33 $\Delta chk1$ (color rojo).

También hemos encontrado una quinasa de la familia de las proteínas C-TAK1 a la que denominamos Par1 por analogía a la proteína PAR-1 de *Caenorhabditis elegans*. No se observaron diferencias entre las estirpes AB33 y MUM61 (AB33 $\Delta par1$) en medio inductor.

Estos resultados sugerían que tanto Srk1 como Chk1 podrían estar implicadas en la regulación del ciclo celular durante la formación del filamento infectivo. Esta regulación podría ocurrir a través de Cdc25.

4. Otros reguladores del paso G2/M, Plk1 y Hsl1

Los resultados obtenidos nos permitían caracterizar parte de la parada de ciclo inducida por las proteínas b, sugiriendo que la regulación del ciclo implicaba un mecanismo robusto con varias proteínas reguladoras involucradas. Por estos motivos, decidimos estudiar otros reguladores de la transición G2/M. En otros organismos se ha descrito que las proteínas del tipo poloquinasa pueden actuar como reguladores positivos de Cdc25 (van Vugt y Medema, 2005; van der Weerd y Medema, 2006) o negativos de Wee1 (Bartholomew *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004), así como proteínas de la familia Nim1/Cdr1 pueden ser reguladores negativos de quinasas tipo Wee1 (Parker *et al.*, 1993; Barral *et al.*, 1998). Como la represión de *plk1* produce una parada del ciclo en G2 y Hsl1 podría estar implicada en la regulación de la longitud de la fase G2 y la adaptación al medio en *U. maydis* (Capítulo II, apartados 3 y 4), decidimos estudiar el papel de estas proteínas en la parada de ciclo inducida por el heterodímero b.

4.1 Los niveles *plk1* y *hsl1* caen cuando se induce el heterodímero b

Lo primero que hicimos fue analizar la expresión del ARNm de *plk1* y *hsl1* durante la inducción de la formación del filamento infectivo en la estirpe AB33. En la Figura 37 se observa que los niveles de ambos mensajeros disminuyeron al inducirse la formación del filamento infectivo.

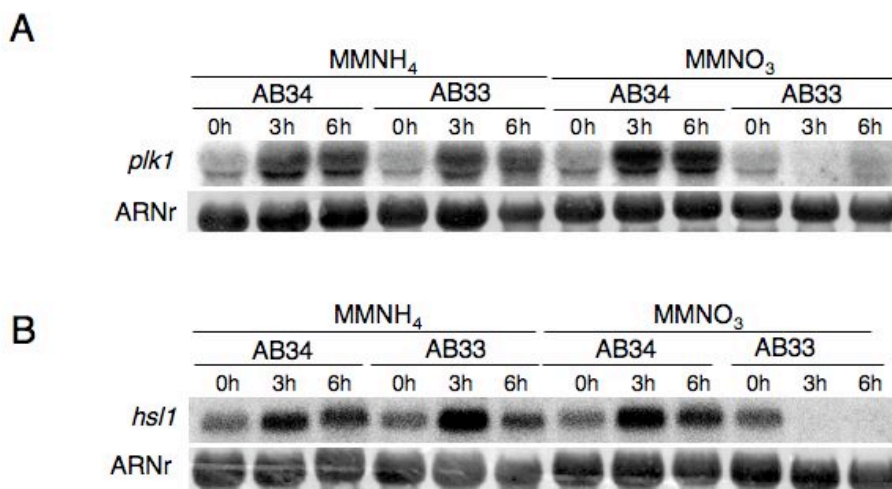


Figura 37. La expresión de *plk1* y *hsl1* disminuye cuando se induce la formación del filamento infectivo. **A.** Análisis de los niveles de ARNm de *plk1* en medio represor (MMNH₄) e inductor (MMNO₃) de las proteínas b. **B.** Análisis de los niveles de ARNm de *hsl1* en MMNH₄ y MMNO₃. En ambos casos las células se crecieron en CMD (tiempo 0h), luego se transfirieron a los medios mínimos y se tomaron muestras cada 3 horas.

Como anteriormente se había observado que la caída de los niveles de *clb1* estaba asociada a la parada de ciclo, decidimos analizar la regulación de la expresión de *plk1* y *hsl1* cuando se inducían las proteínas b sin parada de ciclo celular. Para ello utilizamos la estirpe UMC20 (AB33 *Pnar1cdk1^{AF}myc*) donde se induce simultáneamente la expresión de las proteínas b y la versión refractaria a fosforilación inhibitoria Cdk1^{AF}myc. Observamos que los niveles de *plk1* no disminuyeron en medio inductor mientras que los niveles de *hsl1* sí lo hicieron (Fig 38).

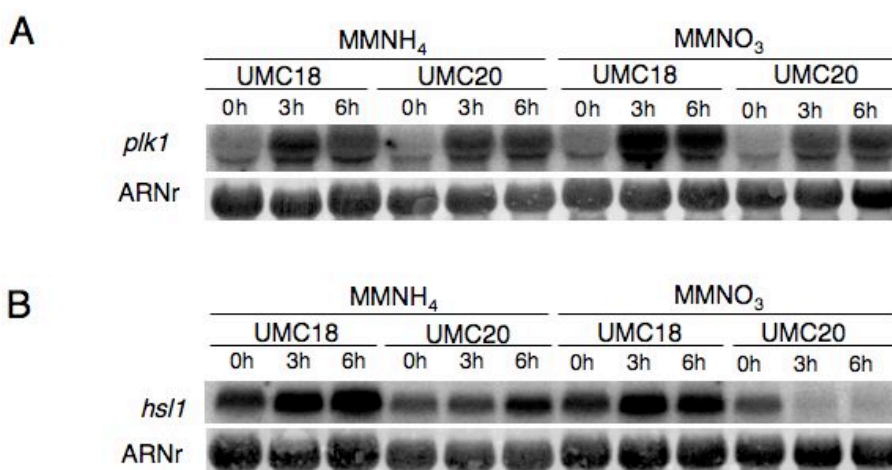


Figura 38. Expresión de *plk1* y *hsl1* cuando se induce la formación del filamento infectivo pero no se detiene el ciclo celular. Ver texto en la siguiente página.

Figura 38. Expresión de *plk1* y *hsl1* cuando se induce la formación del filamento infectivo pero no se detiene el ciclo celular. **A.** Análisis por Northern blot de los niveles de ARNm de *plk1* en medio represor (MMNH₄) e inductor (MMNO₃) en las estirpes UMC18 (AB34 *Pnar1cdk1^{AF}myc*) y UMC20 (AB33 *Pnar1cdk1^{AF}myc*). **B.** Análisis de los niveles de ARNm de *hsl1* en medio represor (MMNH₄) e inductor (MMNO₃) en las mismas estirpes. En ambos casos las células se crecieron en CMD (tiempo 0h) y luego se transfirieron a los medios mínimos con las distintas fuentes de nitrógeno y se tomaron muestras cada 3 horas.

Estos resultados sugerían que la caída de los niveles de *hsl1* era dependiente del heterodímero b mientras que la caída de los niveles de *plk1* podría ser una consecuencia de la parada del ciclo celular.

5. Dos paradas en G2

5. 1 Las expresiones de *plk1* y *hsl1* son reguladas en forma diferente en la parada de ciclo inducida por feromona

Para comprender el posible papel de *plk1* y *hsl1* en la parada de ciclo inducida por las proteínas b, decidimos estudiar la expresión de estos genes cuando se activa el *locus a*, puesto que la activación del sistema feromona-receptor también produce una parada de ciclo en G2 (García-Muse *et al.*, 2003) y un crecimiento polar (Spellig *et al.*, 1994). Para ello utilizamos la estirpe UMN4 que mimetiza la respuesta a feromona cuando es crecida en arabinosa. Como se muestra en la Figura 39 los niveles de *hsl1* disminuyeron en medio con arabinosa mientras que no se observó caída de los niveles de *plk1* en medio inductor.

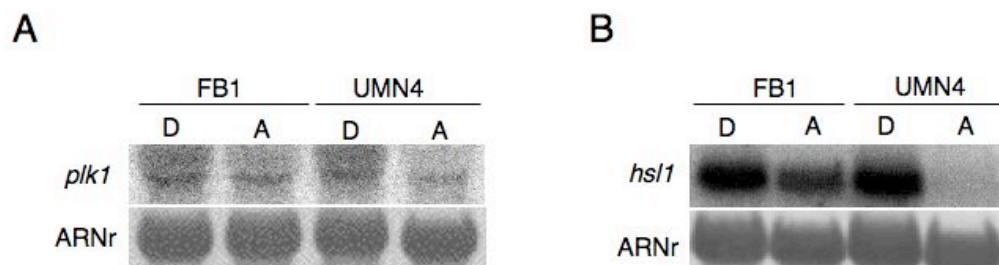


Figura 39. Análisis de la expresión de *plk1* y *hsl1* cuando se induce el sistema feromona-receptor. Ver texto en la siguiente página.

Figura 39. Análisis de la expresión de *plk1* y *hsl1* cuando se induce el sistema feromona-receptor. Las estirpes FB1 y UMN4 fueron cultivadas en medio CMD y luego se transfirieron a CMD (D: glucosa, represor del sistema) y CMA (A: arabinosa, inductor del sistema). Las muestras se tomaron tras 8 horas de cultivo. **A.** Northern blot para analizar los niveles de ARNm de *plk1*. **B.** Northern blot para analizar los niveles de ARNm de *hsl1*.

Estos resultados sugerían que la caída de los niveles de ARNm observada en la estirpe AB33 no solo podía explicarse como una causa o consecuencia de la parada del ciclo celular, sino que tal vez estaba asociada a procesos particulares relacionados con Hsl1 y Plk1. Pensamos dos escenarios posibles, uno en el que consideramos el crecimiento polar como aspecto común entre los procesos inducidos por los *loci a* y *b*, en este caso la regulación de *hsl1* podría responder a cambios morfogénicos. Y otro escenario donde consideramos como posible diferencia la duración de la parada de ciclo, siendo la parada inducida por feromona una parada breve que conduce al encuentro con el compañero compatible, mientras que la parada inducida por las proteínas *b* abarca desde la formación del filamento infectivo hasta la penetración del tejido vegetal. En este caso, Plk1 podría estar manteniendo una parada de ciclo por tiempos prolongados.

5.2 Polaridad y parada de ciclo

Para comprender si la regulación de *hsl1* responde a cambios morfogénicos, analizamos la expresión de *hsl1* en estirpes donde se ha observado crecimiento polar sin parada de ciclo celular. Para ello, estudiamos la regulación transcripcional de *hsl1* en las estirpes UME61, UMP73 y SONU58 que producen un crecimiento polar sin parada de ciclo en medios con arabinosa (Garrido *et al.*, 2004; Castillo-Lluva y Pérez-Martín, 2005; Mahlert *et al.*, 2006). Tras 8 horas en medio inductor, los niveles de *hsl1* en estas estirpes no caían a pesar del crecimiento polar (Fig. 40). Estos resultados sugerían los niveles de *hsl1* estarían regulados por los *loci a* y *b* independientemente del crecimiento polar y de la parada del ciclo celular.

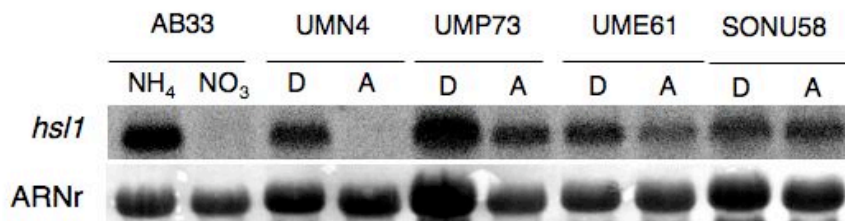


Figura 40. La expresión de *hsl1* disminuye cuando se induce la expresión de los genes de los loci *a* y *b*. Las muestras se tomaron tras 8 horas de cultivo en medio represor (NH₄ para AB33 y D, glucosa, para el resto de las estirpes) y medio inductor (NO₃ para AB33 y A, arabinosa, para el resto de las estirpes). Todas las estirpes presentan crecimiento polarizado, las estirpes AB33 y UMN4 con un solo núcleo mientras que el resto de las estirpes (UME61, UMP73, SONU83) presentan más de un núcleo por filamento.

5.3 Altos niveles de *plk1* y *hsl1* no son suficientes para activar la parada de ciclo

Considerando estos resultados estudiamos el efecto sobre la parada del ciclo celular de la expresión constitutiva de *plk1* y de *hsl1*.

Para ello, se construyó la estirpe MUM37 (AB33 *plk1*^{tef1}) donde se reemplazó el promotor *P_{plk1}* por el promotor constitutivo *P_{tef1}* (Fig. 41A y B). Se observó un núcleo por filamento en la estirpe MUM37 en medio inductor (Fig. 41C) sugiriendo que la disminución de los niveles de *plk1* no influía en la parada de ciclo.

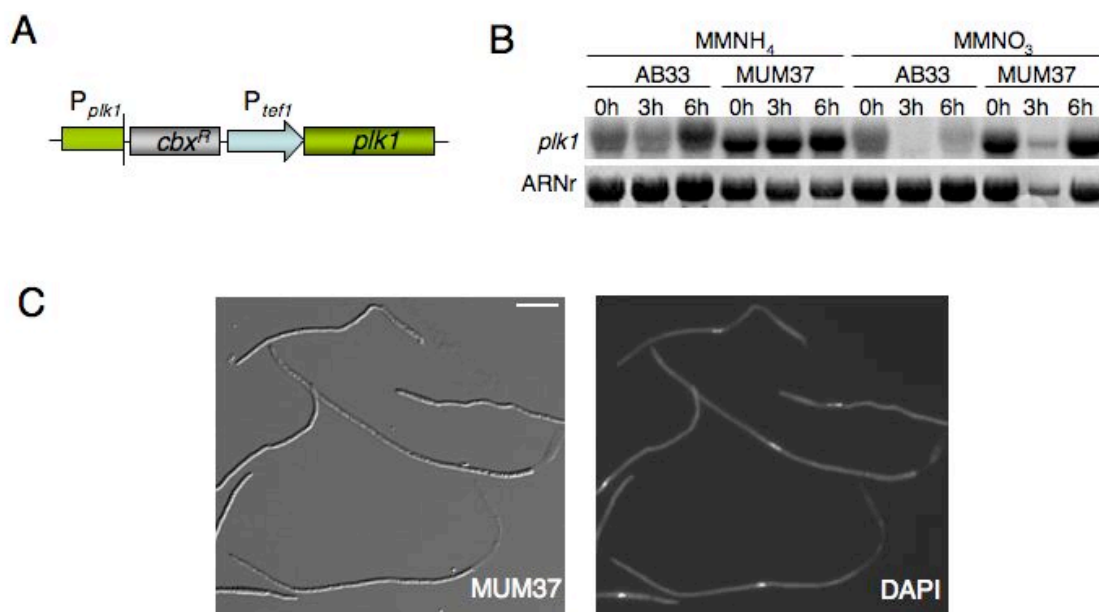


Figura 41. La expresión heteróloga de *plk1* no activa el ciclo celular. Ver texto en la página siguiente.

Figura 41. La expresión heteróloga de *plk1* no activa el ciclo celular. **A.** Esquema de la sustitución del promotor de *plk1* por el promotor *Ptef1*. **B.** Análisis por Northern blot de los niveles de ARNm de *plk1* en las estirpes AB33 y MUM37 (AB33 *plk1^{teff}*). Las células se crecieron en medio represor CMD (tiempo 0h al transferir las células) y luego se cambiaron a MMNH₄ (medio mínimo represor) y MMNO₃ (medio mínimo inductor) y se tomaron muestras cada 3 horas. **C.** Filamentos de la estirpe MUM37 en medio inductor. Tras 24 horas se observó un solo núcleo por filamento. Tinción nuclear con DAPI. Barra 10 μ m.

Por otra parte se estudió el efecto de la expresión heteróloga de *hsl1*. Para ello se introdujo el alelo *hsl1HA* bajo la regulación del promotor *Pnar1* en el fondo genético AB33, para poder inducir la formación del filamento infectivo y la expresión de *hsl1HA* simultáneamente. En medio inductor, los núcleos de los filamentos presentaron un aspecto desgarrado (Fig. 42A y C), lo que sugería que el ciclo celular podría progresar a mitosis. Sin embargo, la disposición de la tubulina presentaba un patrón que correspondía con la de la fase G2 (Fig. 42B) sugiriendo que la caída de los niveles de *hsl1* no determinaba la parada de ciclo.

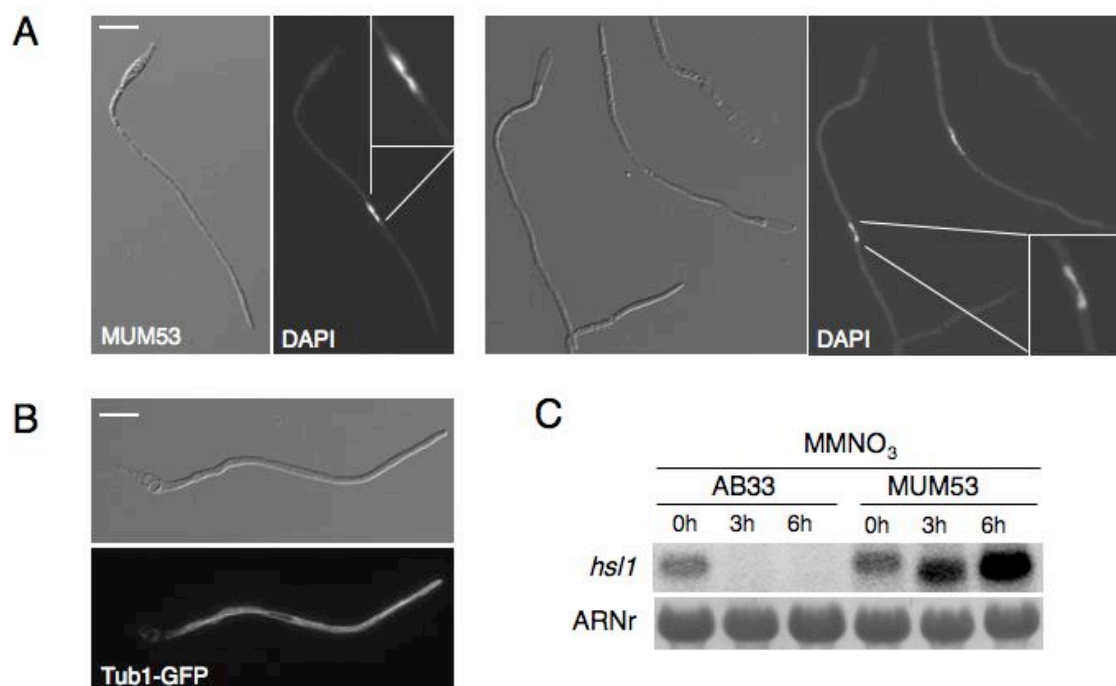


Figura 42. La expresión heteróloga de *hsl1* no activa el ciclo celular. **A** Filamentos de la estirpe MUM53 (AB33 *Pnar1hsl1HA*) tras 6 horas medio inductor. Se observan núcleos desgarrados, en forma de pesa. Tinción nuclear con DAPI. **B.** Disposición de tubulina en la estirpe MUM78 (AB33 *Pnar1hsl1HA Ptef1tub1-GFP*). Barra: 10 μ m para ambas figuras. **C.** Análisis por Northern blot de los niveles de ARNm de *hsl1* en las estirpes AB33 y MUM53. Las células se crecieron en medio represor CMD (tiempo 0h al transferir las células) y luego se cambiaron a MMNO₃ (medio mínimo inductor) y se tomaron muestras cada 3 horas.

6. Mantenimiento de la parada de ciclo sobre la planta

6.1 *plk1* no se expresa sobre la superficie vegetal pero sí dentro de la planta

Si, como propusimos anteriormente, *plk1* estuviera involucrado en el mantenimiento de la parada de ciclo su expresión debería mantenerse apagada en el filamento infectivo sobre la superficie de la planta y activarse una vez que el filamento penetrara la superficie vegetal. Para determinarlo, analizamos la regulación de la expresión de *plk1* en el momento previo y posterior a la penetración del tejido vegetal. Para ello, se colocó bajo el promotor *Pplk1* una versión triple de la proteína GFP fusionada a una señal de localización nuclear en el fondo genético SG200, que permite mimetizar los procesos de reconocimiento de dos estirpes compatibles, formación del filamento infectivo e infección de la planta, generando la estirpe MUM74.

Se analizó la señal de fluorescencia en medio líquido y en placas de PD-charcoal (medio inductor de filamentos en el fondo genético SG200) para comprobar el funcionamiento del sistema reportero. Como se muestra en la Figura 43, en medio CMD donde las células crecen como levaduras se observó una fuerte señal nuclear, mientras que los filamentos inducidos en placas con carbón activo no presentaron señal fluorescente.

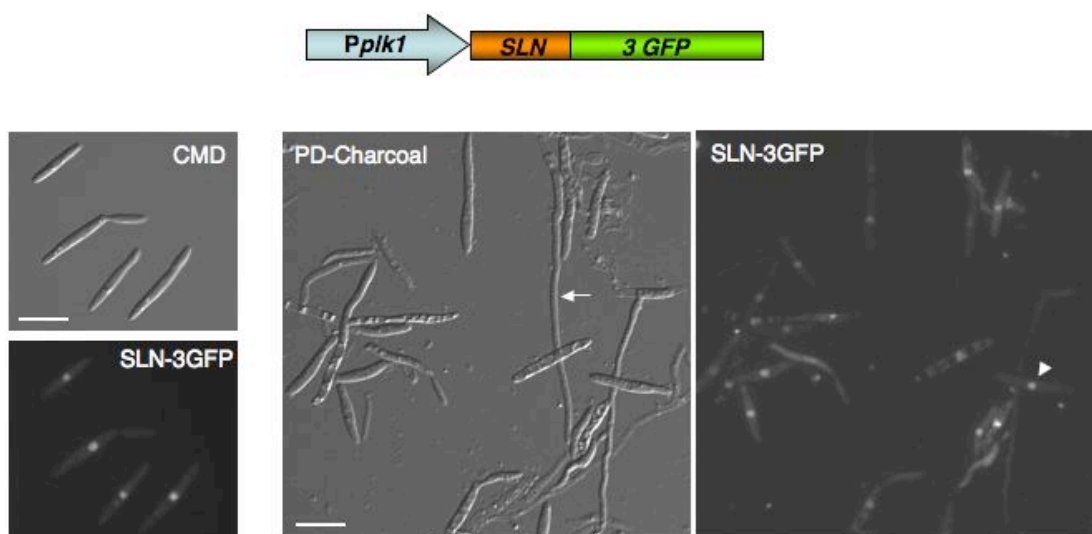


Figura 43. Regulación del promotor de *plk1*. Ver texto en la página siguiente.

Figura 43. Regulación del promotor de *plk1*. Esquema de la construcción donde se colocó una triple proteína GFP fusionada a una señal nuclear bajo la regulación del promotor *Pplk1*. La construcción se integró en el locus de la succinato deshidrogenada. En el panel de la izquierda se observan células creciendo como levaduras en medio CMD con señal fluorescente en los núcleos. En el panel de la derecha se muestra el aspecto de las células cuando fueron cultivadas sobre placas con PD-Charcoal. Se observan levaduras con señal fluorescente en el núcleo (punta de flecha) y filamentos sin señal nuclear (flecha). Los núcleos se observaron por fluorescencia GFP. Barra: 10 μ m.

Cuando se analizó la estirpe MUM74 sobre el tejido vegetal, no se observó señal GFP en el núcleo de los filamentos, sin embargo se observó señal fluorescente en los núcleos de las células que presentaban aspecto de levadura (Fig. 44A). Una vez que los filamentos penetraron la superficie vegetal se observó fluorescencia en los núcleos de estas estructuras (Fig. 44B). Estos resultados indicaban que la expresión de *plk1* se apagaba mientras el filamento se encontraba en la superficie vegetal, pero que se encendía una vez que el filamento se encontraba dentro de la planta y se reasumía el ciclo celular.

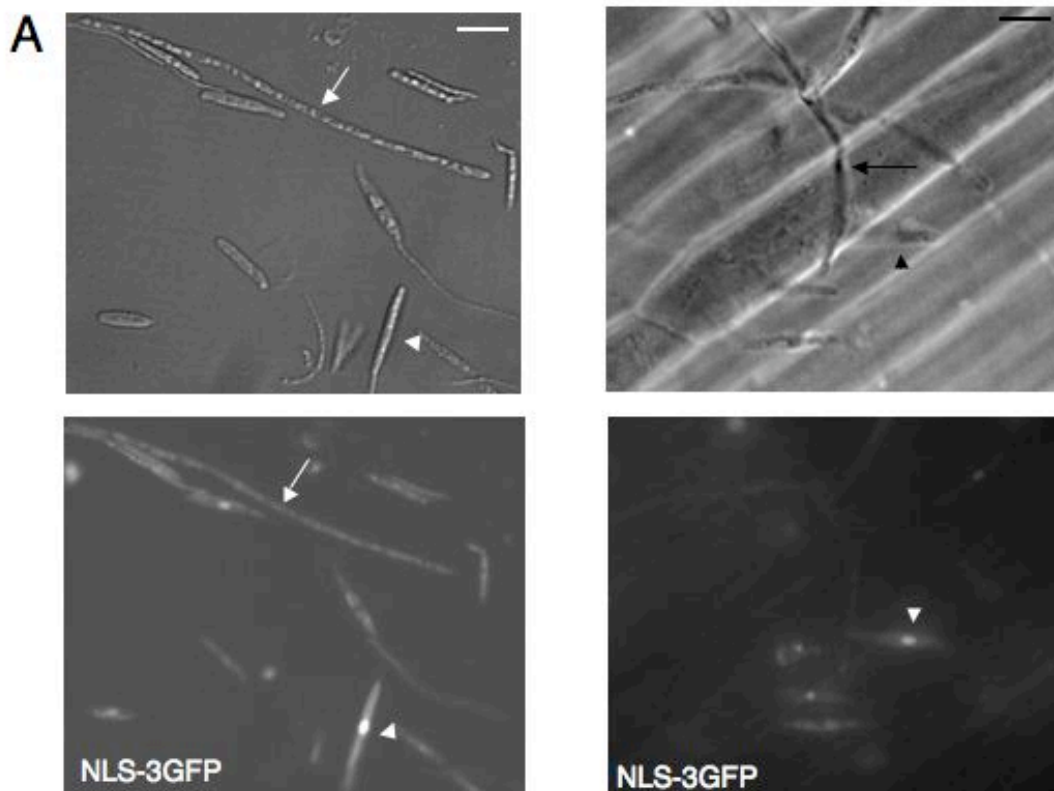


Figura 44. Análisis de la expresión del promotor *Pplk1* sobre la planta y justo cuando se produce la penetración del tejido vegetal . A. Ver texto en la página siguiente.

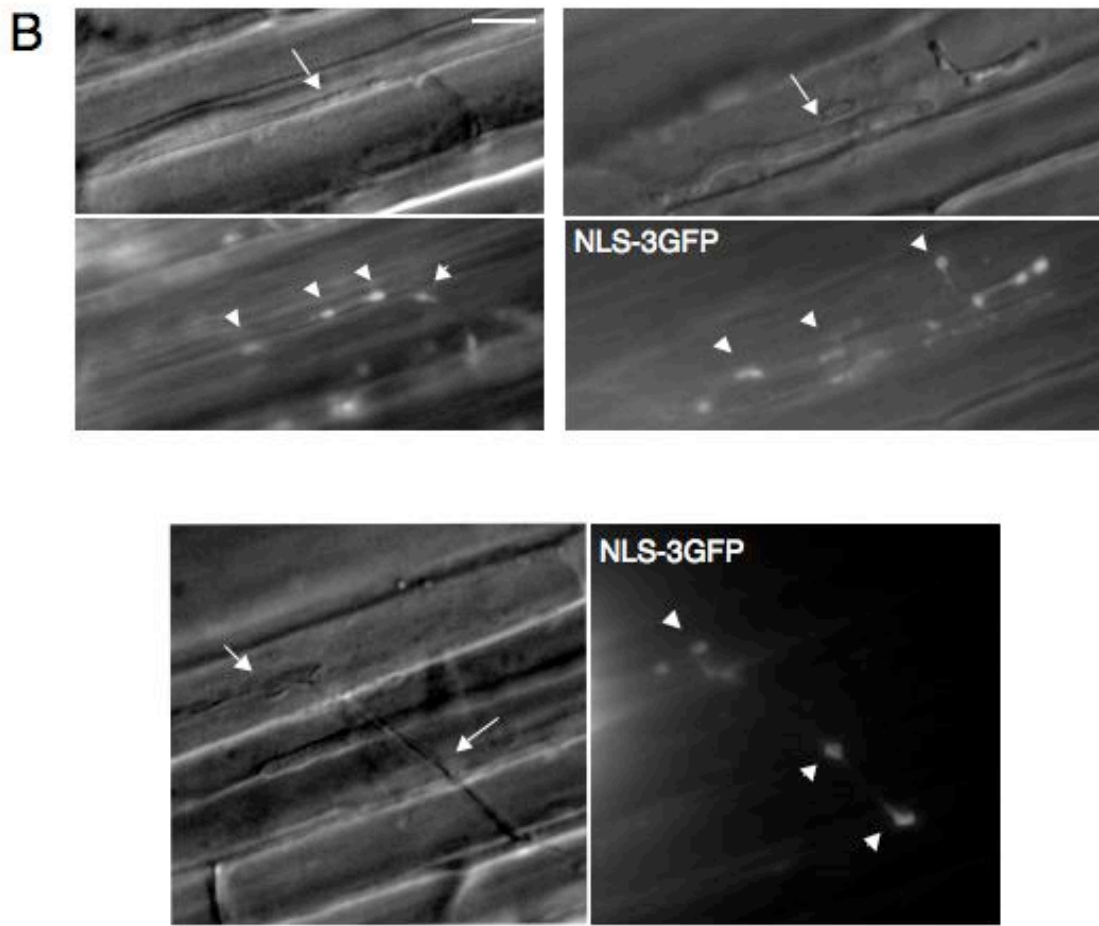


Figura 44. Análisis de la expresión del promotor *Pplk1* sobre la planta y justo cuando se produce la penetración del tejido vegetal . A. Estirpe MUM74 (SG200 *Pplk1* NLS-3GFP) sobre la planta. Se observan filamentos sin señal fluorescente nuclear (flechas) y levaduras con señal fluorescente nuclear (punta de flecha). B. Filamentos de la estirpe MUM74 dentro de la planta. Los filamentos se indican con flechas y los núcleos de los filamentos con una punta de flecha. Los núcleos se observaron por fluorescencia GFP. Barra: 12 μ m.

6.2 Altos niveles de *plk1* no afectan la infección de plantas de maíz

Para estudiar el papel de Plk1 durante el proceso infectivo utilizamos el fondo genético haploide SG200. En este fondo genético se reemplazó el promotor de *plk1* por el promotor constitutivo *Ptef1* generando la estirpe MUM38. Esta estirpe tenía el mismo aspecto algodonoso y un único núcleo por filamento como la silvestre SG200 cuando se cultivaron sobre medio PD-charcoal (Fig. 45A y B).

Por otra parte, ambas estirpes infectaron plantas de maíz con la misma eficacia produciendo los síntomas típicos de la enfermedad (clorosis, manchas de antocianina y tumores) (Fig 45C).

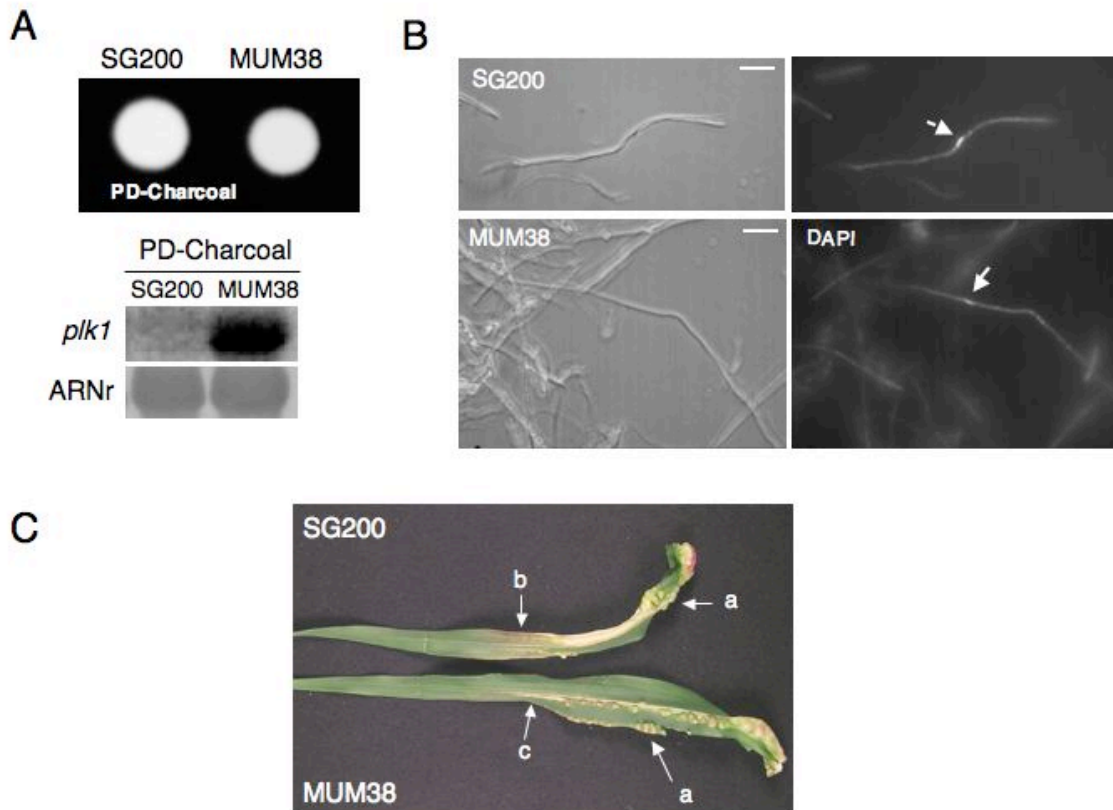


Figura 45. La expresión heteróloga de *plk1* no afecta la formación de filamentos ni la infección de plantas de maíz. **A.** Aspecto de las estirpes SG200 y MUM38 (SG200 *plk1^{tefl}*) sobre medio PD-Charcoal. Análisis por Northern blot del ARNm de *plk1*. El ARN total se extrajo de células crecidas sobre placas con PD-Charcoal. **B.** Aspecto microscópico de los filamentos inducidos sobre las placas PD-Charcoal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 10 μ m. **C.** Aspecto de hojas de plantas de maíz tras 20 días de haber sido infectadas. No hay diferencias entre los síntomas producidos por las estirpes SG200 y MUM38. a: tumores, b: mancha antocianina, c: clorosis.

Estos resultados indicaban que la caída de los *plk1* no era necesaria para infectar las plantas de maíz. Como la caída de los niveles de *plk1* parecía una consecuencia de la parada de ciclo inducida por las proteínas b, pensamos que podría estar involucrada en eventos posteriores al establecimiento de la parada de ciclo, como el mantenimiento de la parada o la reactivación del ciclo celular una vez dentro de la planta.

Reguladores de la transición G2/M

Capítulo II

1. Análisis de la proteína Bmh1

1.1 *U. maydis* tiene una proteína de la familia 14-3-3

Las proteínas del tipo 14-3-3 están involucradas en múltiples procesos celulares, entre ellos la regulación de la transición G2/M a través de la unión a fosfatasa de la familia de Cdc25 (Darling *et al.*, 2005; Hermeking y Benzinger, 2006; van Exuden y Steensma, 2006). Como nuestro objetivo era caracterizar la regulación de este paso del ciclo celular en los primeros estadios del proceso infectivo de *Ustilago maydis*, decidimos estudiar la existencia y el posible papel de un regulador de este tipo. Para ello realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con proteínas del tipo 14-3-3 y encontramos una única secuencia perteneciente a esta familia de proteínas. Esta secuencia, que corresponde al marco de lectura abierto Um01366, presenta 1014 pares de bases con un intrón entre los nucleótidos +67 y +294 (considerando +1 a la adenina del ATG). Denominamos a esta proteína Bmh1 por analogía a las proteínas de *S. cerevisiae*.

El gen *bmh1* codifica una proteína de 261 aminoácidos con un peso molecular de 29,3 kDa. La proteína presenta los 9 dominios α -hélice característicos que abarcan desde el principio de la secuencia hasta el residuo 231. En esta región, Bmh1 presenta una identidad de secuencia del 75%-85% con otras proteínas del tipo 14-3-3 mientras que los últimos 30 aminoácidos del extremo carboxilo terminal no se encuentran conservados entre las distintas proteínas (Fig 46 y Fig.80 ANEXO 2).

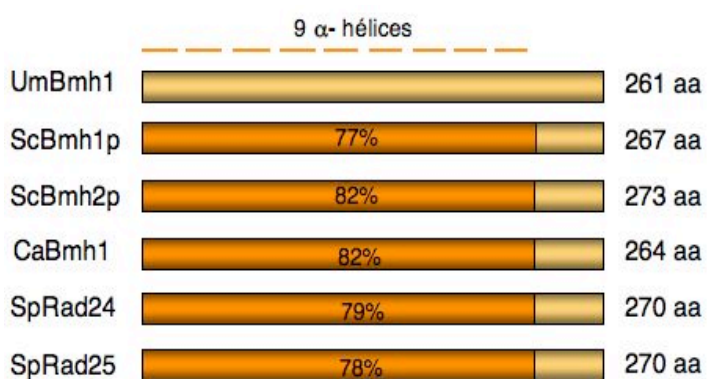


Figura 46. El gen *bmh1* codifica una proteína tipo 14-3-3. Esquema de las proteínas de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Candida albicans* indicando la región conservada que contiene los dominios 9 α -hélice y los porcentajes de identidad.

1.2 *bmh1* es esencial en *U. maydis*

Como primer aproximación en el estudio de Bmh1, se estudió el efecto de la pérdida de función reemplazando el marco de lectura abierto de *bmh1* por el gen que confiere resistencia a higromicina. En los fondos genéticos haploides no se recuperaron células con el marcador de selección, lo que nos sugería la posible esencialidad del gen. Para analizar esta posibilidad se interrumpió una de las copias del gen en la estirpe diploide FBD11 y se estudió la progenie tras la meiosis en medio con y sin selección. El hecho de no observar crecimiento en medio selectivo sugería que el gen era esencial.

Considerando estos resultados construimos la estirpe MUM65 donde se intercambié el promotor de *bmh1* por el promotor *P_{crg1}* regulable por fuente de carbono (FB1 *bmh1^{crg1}*). La expresión de ARNm de *bmh1* se reprimió casi totalmente tras 8 horas en condiciones restrictivas (CMD) mientras que los niveles de mensajero aumentaron con respecto a los de una estirpe silvestre en condiciones permisivas (CMA) (Fig. 47A y B). Los niveles de proteína disminuyeron tras 12 horas en condiciones restrictivas (Fig. 47C).

Para determinar la esencialidad del gen, analizamos el crecimiento en diluciones seriadas. La estirpe MUM65 no creció en condiciones restrictivas, mientras que lo hizo en forma similar al silvestre en condiciones permisivas (Fig. 47D).

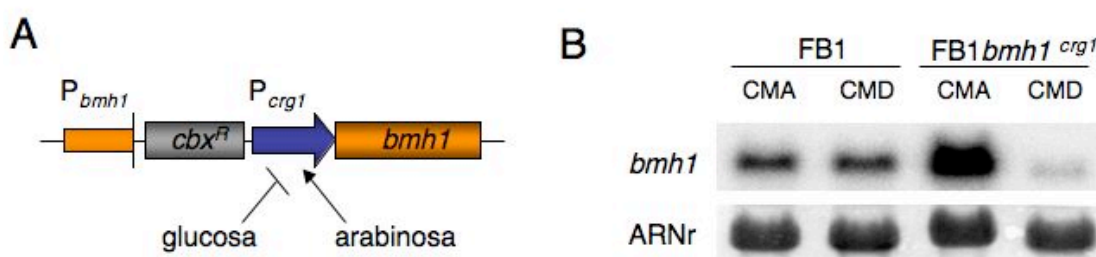


Figura 47. El gen *bmh1* es esencial en *U. maydis*. A. B. Ver texto en la página siguiente.

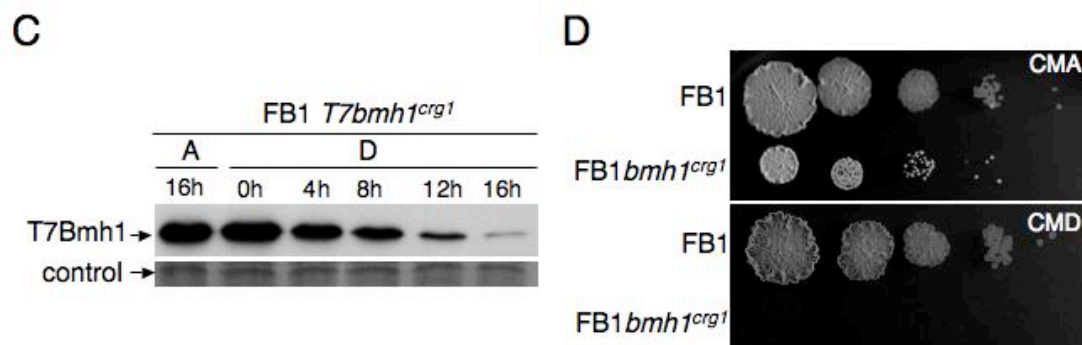


Figura 47. El gen *bmh1* es esencial en *U. maydis*. **A.** Esquema de la construcción *bmh1^{crg1}* con la que se reemplazó el promotor de *bmh1* por el promotor *Pcrg1*. **B.** Análisis de la expresión de ARNm por Northern blot. Ambas estirpes se cultivaron durante 8 horas en CMD (condición restrictiva) y CMA (condición permisiva). **C.** Análisis de Bmh1 por Western blot. La estirpe FB1 *T7bmh1^{crg1}* fue cultivada en CMA (A, arabinosa) y CMD (D, glucosa), se recogieron muestras cada 4 horas. **D.** Ensayo de gotas. Las estirpes se crecieron en CMA, luego se lavaron ajustando la DO_{600nm} inicial a 0,5 y se sembraron en diluciones seriadas. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

1.3 Bmh1 localiza en el núcleo y en el citoplasma

A continuación, analizamos la localización de la proteína expresando el alelo *bmh1-RFP*. Como se muestra en la Figura 48 la proteína presentaba una distribución citoplasmática y nuclear independientemente de la fase del ciclo celular.

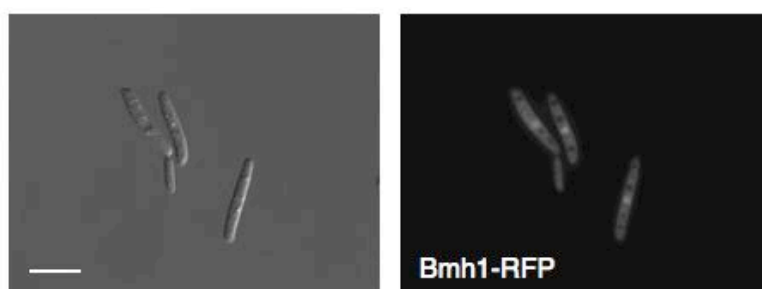


Figura 48. Localización de Bmh1. La estirpe fue crecida en CMD durante 8 horas. Barra: 12 μm .

1.4 Bmh1 podría regular el paso G2/M

Luego se analizaron la morfología y los núcleos de la estirpe MUM65 en cultivo líquido. Tras 11 a 13 horas en condiciones restrictivas se observaron células redondeadas deficientes en separación celular con uno o más núcleos por compartimento celular, mientras que en medio permisivo el aspecto de las células era similar al de las silvestres (Fig. 49). Estas características podían

deberse a una falta de regulación sobre la transición G2/M.

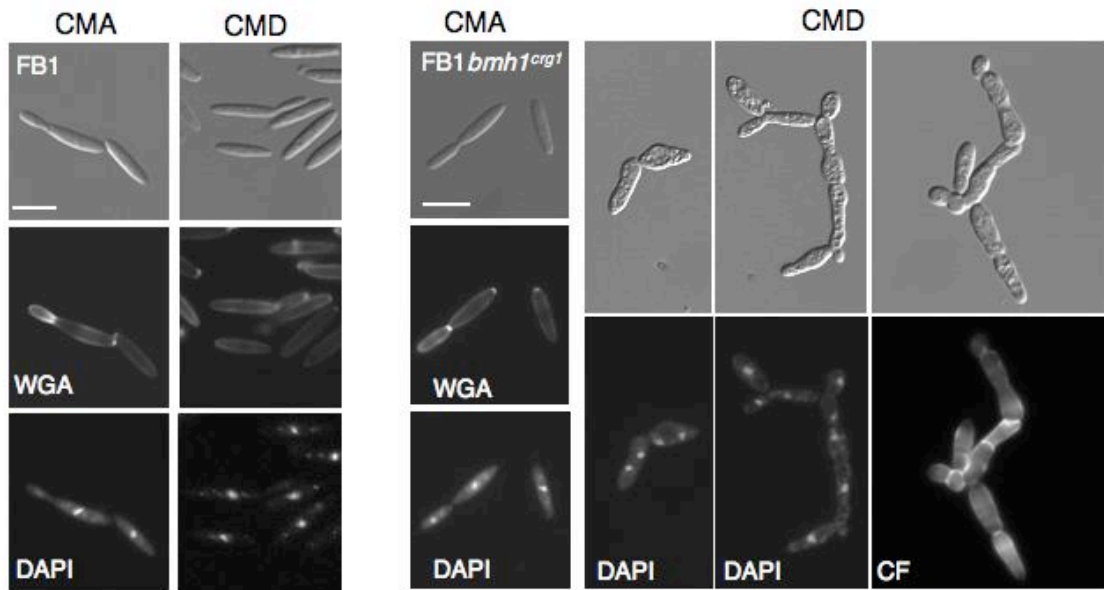


Figura 49. Bmh1 afectaría el paso G2/M. Las estirpes FB1 y MUM65 fueron cultivadas toda la noche en CMA. Luego las células se lavaron y fueron transferidas a los medios CMA (permisivo) y CMD (restrictivo). Tras 11 horas se observó el fenotipo. El panel de la izquierda muestra la estirpe control y el panel de la derecha muestra la estirpe MUM65. Los septos se tiñeron con WGA o CF y los núcleos con DAPI. Barra: 12 μ m.

1.5 Relación entre Bmh1 y Cdc25 en *U. maydis*

Bmh1 interacciona genéticamente con Cdc25

En otros organismos, como en *S. pombe* y *H. sapiens*, se ha descrito que las proteínas 14-3-3 regulan a las proteínas Cdc25 porque son capaces de unirse a la fosfatasa y de retenerla en el citoplasma (Hermeking y Benzinger, 2006; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006; van Exuden y Steensma, 2006). Como el fenotipo observado en la estirpe MUM65 recordaba al descrito para células que sobreexpresan Cdc25, donde el paso no regulado de la fase G2 a M resulta en células que tabican y presentan uno o más de un núcleo (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 b), decidimos estudiar la posible relación entre Bmh1 y Cdc25.

Comenzamos estudiando la interacción genética, para ello utilizamos la estirpe UMC27 donde el promotor de *cdc25* fue reemplazado por el promotor regulable por fuente de nitrógeno *Pnar1* (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005b). Esta estirpe presenta un fuerte crecimiento polar en la gema y una parada del ciclo celular

en G2 en condiciones restrictivas. En este fondo genético se introdujo la construcción *bmh1^{arg1}* y se analizó el fenotipo cuando se apagó la expresión de ambos genes. Como se observa en la Figura 50, el fenotipo observado era similar al del apagado de *cdc25* sugiriendo una posible interacción genética donde Bmh1 regularía negativamente a Cdc25.

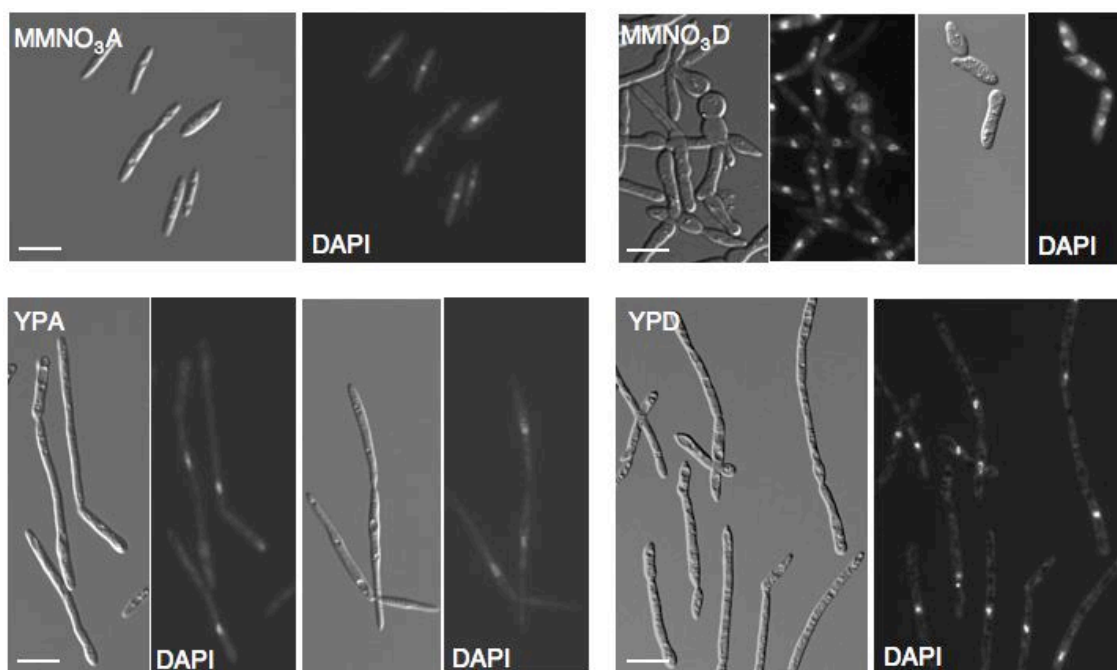


Figura 50. Bmh1 regularía negativamente a Cdc25. Fenotipo de la estirpe MUM83 (FB1 *cdc25^{nar1} bmh1^{arg1}*) en medio permisivo para ambos promotores (MMNO₃A, panel superior izquierdo), medio permisivo para *cdc25^{nar1}* y represor para *bmh1^{arg1}* (MMNO₃D, panel superior derecho), medio represor para *cdc25^{nar1}* y permisivo para *bmh1^{arg1}* (YPA, panel inferior izquierdo) y represor para ambos promotores (YPD, panel inferior derecho). A: arabinosa, D: glucosa. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 10 μ m

La localización de Cdc25 depende de Bmh1

Por otra parte, estudiamos la localización de Cdc25 en *U. maydis*. Para ello se reemplazó el alelo *cdc25* por el alelo *cdc25-3GFP* generando la estirpe UMP112. Se observó señal fluorescente tanto en el núcleo como en citoplasma independientemente de la fase del ciclo celular (Fig. 51A). Cuando se introdujo la construcción *bmh1^{arg1}* en el fondo genético con el alelo *cdc25-3gfp* se observó un incremento en la señal fluorescente en el núcleo tras 11 horas en condiciones de apagado de *bmh1^{arg1}* (Fig. 51B).

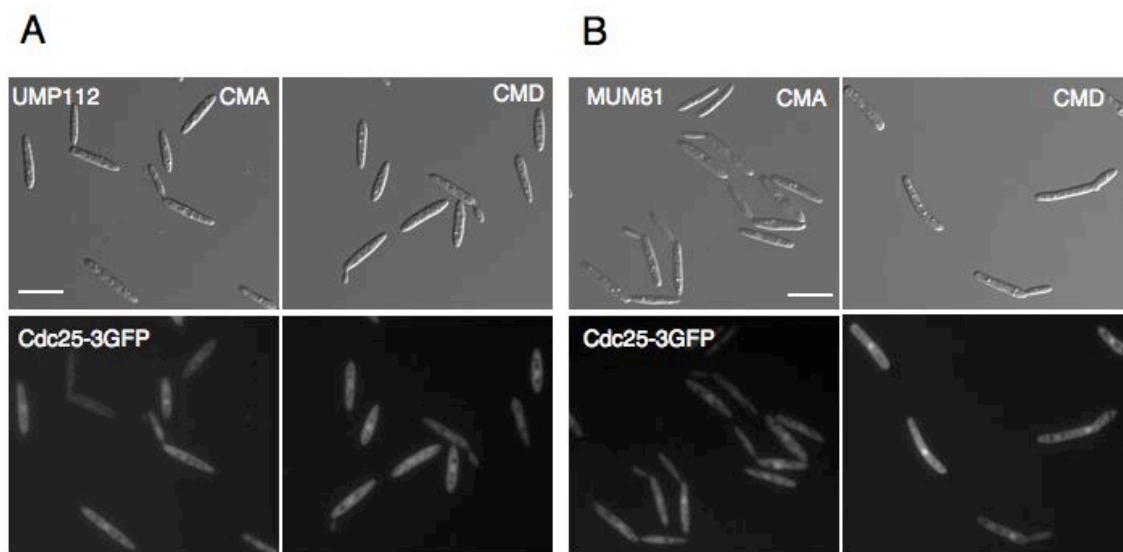


Figura 51. Bmh1 afecta la localización de Cdc25. **A.** Localización de Cdc25-3GFP en CMD y CMA. Se observa señal GFP en el núcleo y citoplasma en todas las fases del ciclo. **B.** La estirpe MUM81 se creció en CMA y luego se transfirió a CMD y CMA. Tras 11 horas de cultivo, cuando se reprime *bmh1^{cg1}* en medio CMD, se observa un aumento de la señal de Cdc25-3GFP en el núcleo. Barra: 12 μm.

Cdc25^{AAA} disminuye la interacción con Bmh1 y causa una entrada prematura mitosis

Las proteínas 14-3-3 reconocen motivos específicos de Cdc25 que contienen residuos fosforilados de serina o treonina. Se ha descrito que estos residuos son fosforilados por quinasas de control a daño a ADN como Chk1, quinasas activadas por la ruta p38/MAPK como MK2 y Srk1 y la quinasa asociada a Cdc25 C-TAK1 provocando la retención de Cdc25 en el citoplasma y el retraso del ciclo celular (Sanchez *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1997, Peng *et al.*, 1998; Lopez-Girona *et al.*, 1999; Manke *et al.*, 2005; López-Avilés *et al.*, 2005). Basándonos en la similitud de los motivos de fosforilación de Chk1 y MK2 (O'Neill *et al.*, 2002; Manke *et al.*, 2005; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006) y en que la quinasa Srk1 sería capaz de fosforilar algunos de los residuos que fosforila Chk1 (López-Avilés *et al.*, 2005; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006) definimos una secuencia consenso que podría corresponder con un sitio de reconocimiento de Bmh1 en *U. maydis* (Fig. 52).

Cuando analizamos la secuencia de Cdc25 de *U. maydis*, encontramos 5 putativos sitios de unión a Bmh1, dos de los cuales, que implicarían la

fosforilación de los residuos S460 y T584, coinciden con la secuencia consenso determinada. Existe un tercer sitio, que aunque no coincide exactamente con el consenso, se encuentra situado junto a una posible señal de localización nuclear como en otras proteínas Cdc25 (Kumagai y Dunphy, 1999). Este motivo implicaría la fosforilación del residuo S214 (Fig. 52). Para analizar la posible regulación de la interacción Cdc25-Bmh1 mediada por estos sitios de fosforilación, se construyó el alelo *cdc25^{AAA}* donde se sustituyeron estos tres residuos por sendos residuos de alanina no fosforilable (Fig. 52).

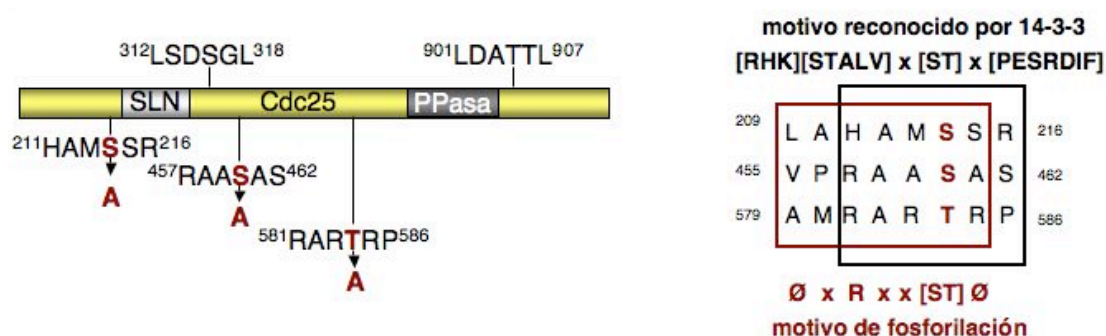


Figura 52. Esquema de la proteína Cdc25 con los 5 putativos sitios de unión a Bmh1. Se indican las sustituciones realizadas en los tres posibles sitios de reconocimiento por proteínas del tipo 14-3-3. También se muestra la secuencia del motivo de reconocimiento y el solapamiento con el motivo de fosforilación determinado en *U. maydis*.

En primer lugar se estudió la funcionalidad de este alelo. Para ello se colocó bajo la regulación del propio promotor de *cdc25* y se integró en el *locus* de la succinato deshidrogenasa de la estirpe UMC27 (FB1*cdc25^{nar1}*) para analizar la complementación sobre medio sólido. Se usó como control una versión del alelo silvestre *cdc25* expresada en las mismas condiciones. Como se muestra en la Figura 53, ambos alelos permitieron el crecimiento en condiciones restrictivas para *cdc25^{nar1}*.

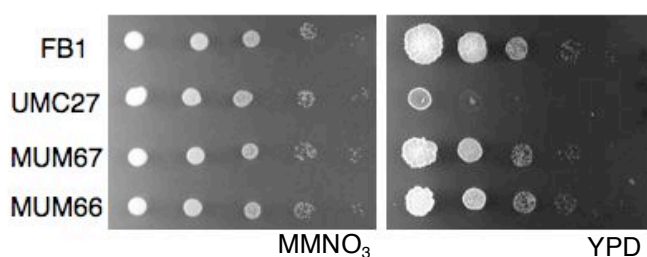


Figura 53. Las estirpes se crecieron en MMNO₃. Luego se lavaron las células y se sembraron en condiciones permisivas (MMNO₃) y restrictivas (YPD) para UMC27.

Luego se estudió la interacción entre las proteínas Cdc25 y Bmh1. Para ello se construyeron las estirpes UMP125 y UMP126. Ambas estirpes expresaban el alelo *bmh1HA*. Por otra parte, la estirpe UMP125 sobrexpresaba el alelo *cdc25^{AAA}myc* y la estirpe UMP126 el alelo *cdc25myc*, en ambos casos bajo la regulación del promotor *Pcrg1*. La presencia de los residuos no fosforilables disminuyó la interacción entre las proteínas cuando se analizó en medio inductor del promotor *Pcrg1*, sugiriendo que eran necesarios para el reconocimiento de las proteínas (Fig. 54).

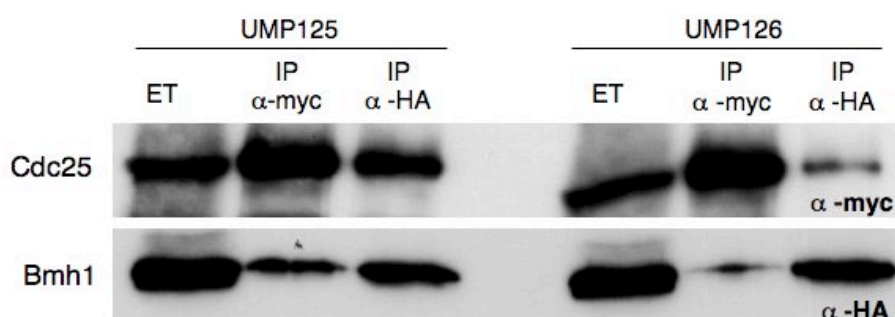


Figura 54. La versión Cdc25^{AAA} disminuye la interacción entre Bmh1 y Cdc25. Los lisados de las estirpes UMP125 (FB1 *bmh1HA Pcrg1cdc25myc*) y UMP126 (FB1 *bmh1HA Pcrg1cdc25^{AAA}myc*) se inmunoprecipitaron con los anticuerpos α- [myc](IP α-myc) y α-[HA] (IP α-HA). Luego se realizó un Western blot y las membranas se revelaron con anticuerpos α-[myc-peroxidasa] y α-[HA-peroxidasa]. ET: extracto total, α-myc: membrana revelada con α-[myc-peroxidasa], α-HA: membrana revelada con α-[HA-peroxidasa]

A continuación, se estudió el crecimiento de la estirpe AB33*cdc25^{AAA}* (MUM57) donde el alelo *cdc25^{AAA}* se colocó bajo el promotor *Pcdc25* y se integró en el *locus* de la succinato deshidrogenada y de la estirpe AB33*cdc25* (MUM58), donde se expresó el alelo silvestre *cdc25* en las mismas condiciones. Al analizar las células en medio CMD, se observó que la estirpe MUM57 presentaba células de menor tamaño que las controles (Fig. 55A). Por otra parte, al analizar el contenido de ADN observamos que la estirpe MUM57 acumulaba células con contenido 1C (Fig. 55B). Estos resultados sugerían el alelo *cdc25^{AAA}* se comportaba como una versión no regulada de Cdc25 que provocaba un paso rápido de G2/M generando células más pequeñas y una fase G1 más prolongada para compensar.

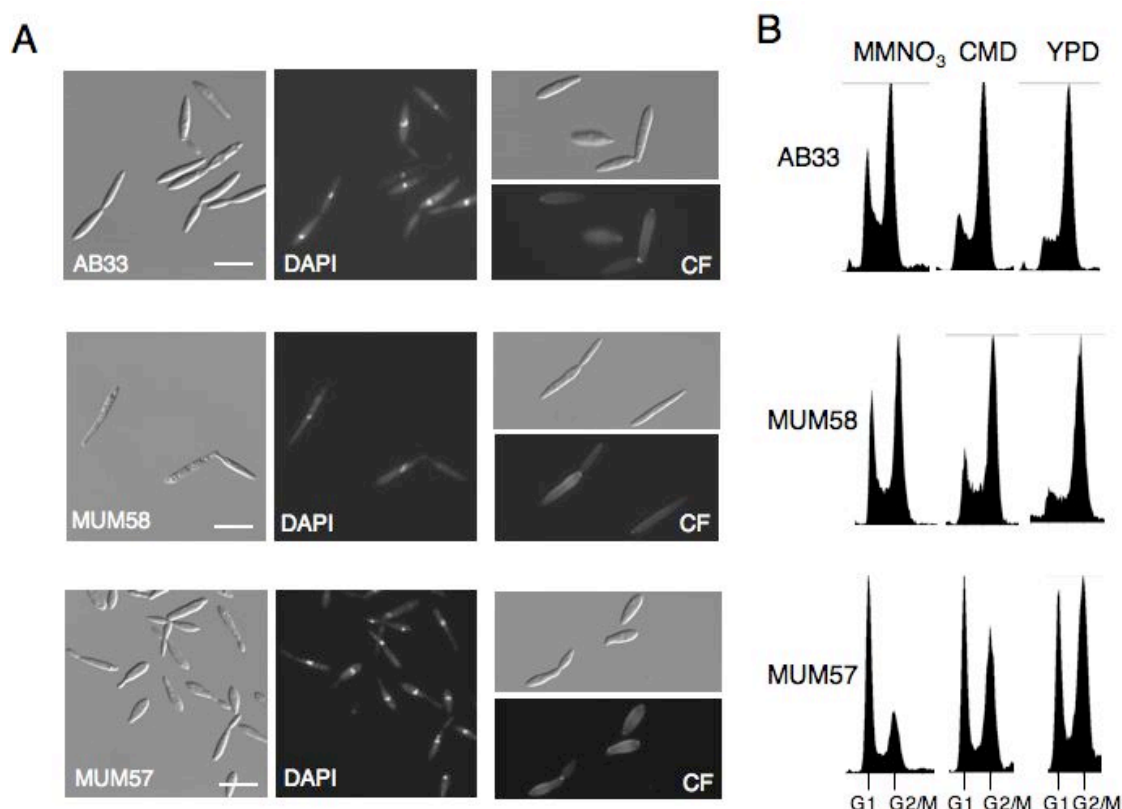


Figura 55. La versión $Cdc25^{AAA}$ acelera la entrada en mitosis. **A.** Fenotipo de las estirpes AB33, MUM58 y MUM57 crecidas en CMD durante 8 horas. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 12 μ m. **B.** Análisis del contenido de ADN. Las células de las estirpes se crecieron en CMD, luego se lavaron, se transfirieron a MMNO₃, CMD e YPD y se recogieron tras 8 horas de cultivo en cada medio.

Estos resultados sugerían que la interacción entre Bmh1 y Cdc25 estaba involucrada en la regulación del paso G2/M y que implicaba al menos uno de los residuos sustituidos en la fosfatasa.

Bmh1 y Cdc25 están involucradas en el control del ciclo por daño a ADN

Como se mencionó anteriormente, la interacción entre las proteínas 14-3-3 y Cdc25 está implicada en el control del daño a ADN (Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006). El siguiente paso fue estudiar si estas proteínas estaban implicadas en este proceso en *U. maydis*. Para ello, analizamos la viabilidad de las colonias de las estirpes MUM68 (AB33 *bmh1^{crg1}*), MUM57 (AB33 *cdc25^{AAA}*) y MUM58 (AB33 *cdc25*) sometidas distintos pulsos de luz UV.

La estirpe MUM68 fue cultivada en condiciones restrictivas para asegurar la ausencia de Bmh1 en el momento de para aplicar el pulso de luz UV.

Como se observa en la Figura 56, las estirpes MUM57 y MUM68 fueron sensibles al tratamiento mientras que la estirpe MUM58 se comportó como la silvestre.

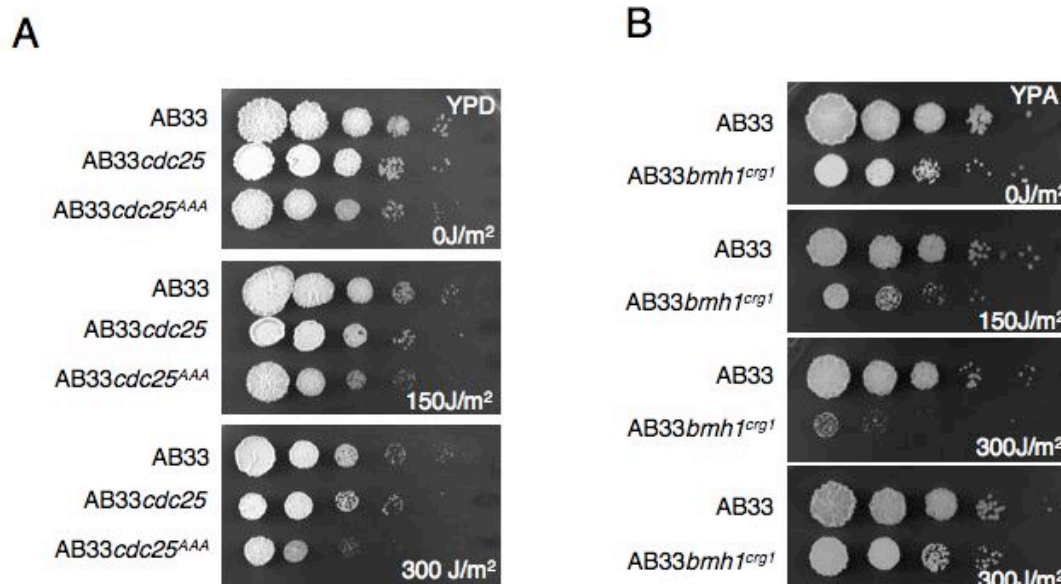


Figura 56. Viabilidad luego del pulso con luz UV A. Diluciones seriadas de las estirpes con los alelos *cdc25^{AAA}* y *cdc25* sometidas a los pulsos de luz UV. **B.** La estirpe MUM68 se cultivó 11 horas en CMD (condición restrictiva), luego se realizaron las diluciones seriadas sobre medio permisivo (YPA) y se dieron los pulsos de UV. La segunda placa sometida a 300 J/m² corresponde a la estirpe MUM68 crecida durante 11 horas en condiciones permisivas (CMA). En todos los casos las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

2. Análisis de las proteínas Chk1 y Srk1

2.1 *U. maydis* tiene una quinasa del tipo Chk1

Con estos resultados decidimos estudiar la existencia y el papel de quinasas del tipo Chk1 involucradas en el control del ciclo por daño al ADN (Walworth *et al.*, 1993; Al-Khodairy *et al.*, 1994) en *U. maydis*. Para ello realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con otras proteínas de esta familia y encontramos una única proteína que corresponde al marco de lectura abierto Um11087. Denominamos a esta proteína Chk1 por analogía a otras quinasas de la familia.

El gen *chk1* presenta 1989 nucleótidos y codifica para una proteína de 662 aminoácidos con un peso molecular de 72,5 kDa. El dominio quinasa se encuentra en el extremo amino terminal y se extiende hasta la mitad de la secuencia. La proteína presenta una identidad de secuencia del 30%-45% con otras proteínas Chk1 (Fig. 57 y Fig. 81 ANEXO2).

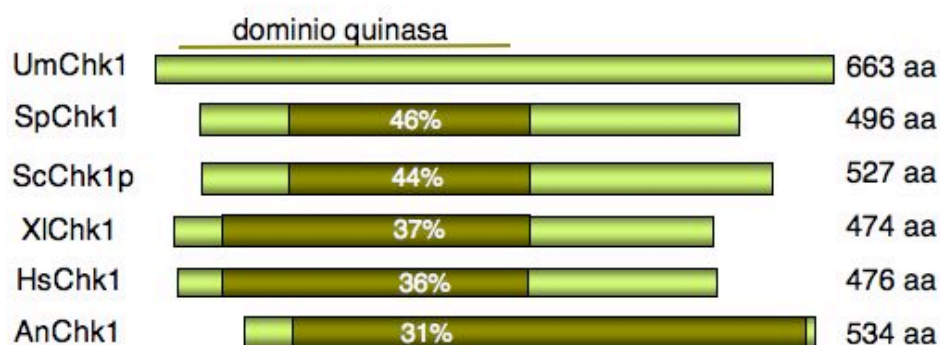


Figura 57. El gen *chk1* codifica una proteína tipo Chk1. Esquema de las proteínas de *Ustilago maydis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Xenopus laevis*, *Homo sapiens* y *Aspergillus nidulans* indicando el dominio quinasa, las regiones conservadas y los porcentajes de identidad.

2.2 *chk1* no es esencial en *U. maydis*

Comenzamos el estudio de esta proteína analizando el efecto de la pérdida de función sustituyendo la secuencia codificante de *chk1* por el gen que confiere resistencia a higromicina (Fig. 58A).

La sustitución se realizó en los fondos genéticos haploides obteniendo las estirpes UMP118 (FB1 $\Delta chk1$) y UMP 114 (AB33 $\Delta chk1$). En medio líquido CMD las estirpes $\Delta chk1$ presentaron el mismo fenotipo que las silvestres (Fig. 58B). Sin embargo al analizar la respuesta por daño a ADN, las estirpes con el alelo $\Delta chk1$ presentaron seriamente comprometida la supervivencia ante la irradiación con luz UV (Fig. 58C).

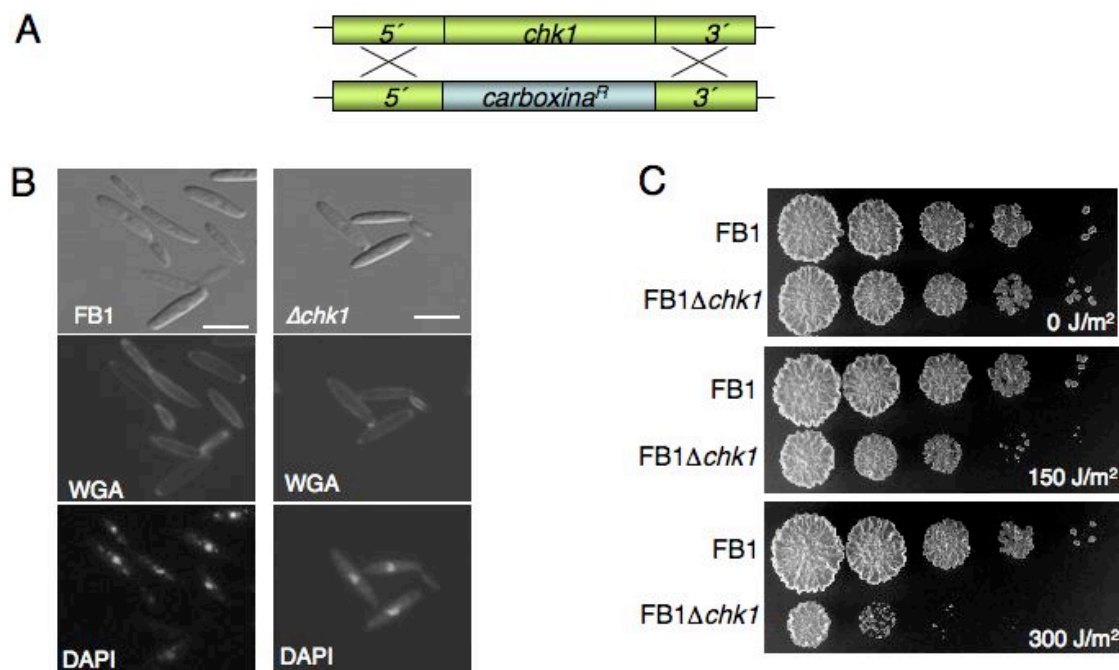


Figura 58. El gen *chk1* no es esencial. Esquema de la sustitución génica con la que se reemplazó el gen *chk1* por el gen de resistencia a carboxina. **B.** Fenotipo observado tras 8 horas de cultivo en CMD. Los septos se tiñeron con WGA y los núcleos con DAPI. Barra: 12 μ m. **C.** La estirpe FB1 $\Delta chk1$ y la silvestre fueron crecidas en medio CMD, luego fueron sembradas en diluciones seriadas y sometidas al pulso de luz UV. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

2.3 *U. maydis* tiene una proteína tipo Srk1

La proteína Srk1 es una serin-treonin quinasa activada por la ruta MAPK de Sty1 (*Sty1-regulated kinase*) (Smith *et al.*, 2002), capaz de fosforilar Cdc25 e inhibir a la fosfatasa de forma dependiente de Rad24 (López-Avilés *et al.*, 2005).

Decidimos estudiar la existencia y el posible papel de un regulador capaz de transmitir una señal de estrés al ciclo celular en *U. maydis*. Para ello realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con proteínas del tipo Srk1 y encontramos una única secuencia que corresponde al marco de lectura abierto Um10056. Esta secuencia presenta 3502 pares de bases con tres intrones entre los nucleótidos +68 y +490, +1017 y +1639, +1683 y +2089 (considerando +1 a la adenina del ATG). Denominamos a esta proteína Srk1 por analogía a la proteína de *S. pombe*.

El gen *srk1* codifica una proteína de 685 aminoácidos con un peso molecular de 73,94 kDa. La proteína posee un dominio quinasa que abarca desde el

aminoácido 158 al 460. También se detectaron putativos sitios de fosforilación por MAPK en la región consecutiva al dominio quinasa. Toda la secuencia de la proteína *Srk1* presenta una identidad del 46% con la homóloga de *A. nidulans*. Mientras que con las homólogas *Srk1* de *S. pombe*, *C. albicans* y *Rck1p* y *Rck2p* de *S. cerevisiae* la región conservada abarca el dominio quinasa y regiones adyacentes con una identidad de secuencia que varía del 37 al 52% (Fig. 59 y Fig. 82 ANEXO 2).

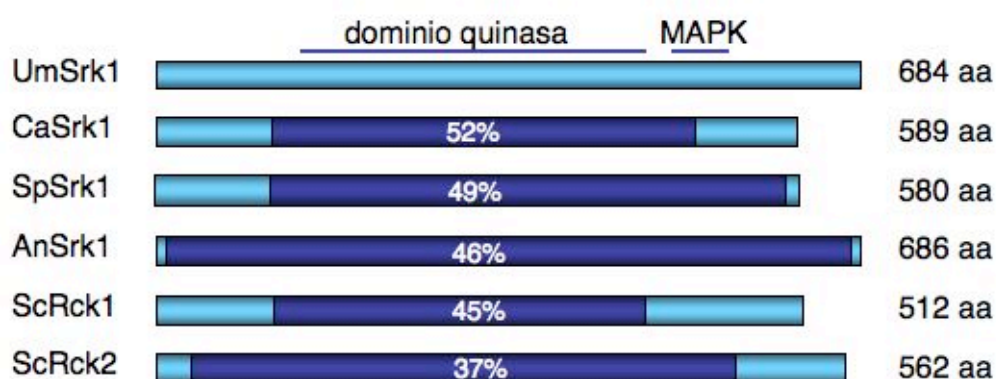


Figura 59. El gen *srk1* codifica una proteína tipo *Srk1*. Esquema de las proteínas de *Ustilago maydis*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Aspergillus nidulans* y *Saccharomyces cerevisiae* indicando el dominio quinasa, la región sustrato de proteínas MAPK, la región conservada y los porcentajes de identidad.

srk1* no es esencial en *U. maydis

Analizamos el efecto de la pérdida de función de *Srk1* en *U. maydis*. Para ello se reemplazó el gen *srk1* por el gen que confiere resistencia a la carboxina. Como se observa en la Figura 60, la estirpe UMP101 (AB33 Δ *srk1*) no presentó diferencias con respecto a la silvestre AB33 cuando fue cultivada en medio líquido CMD.

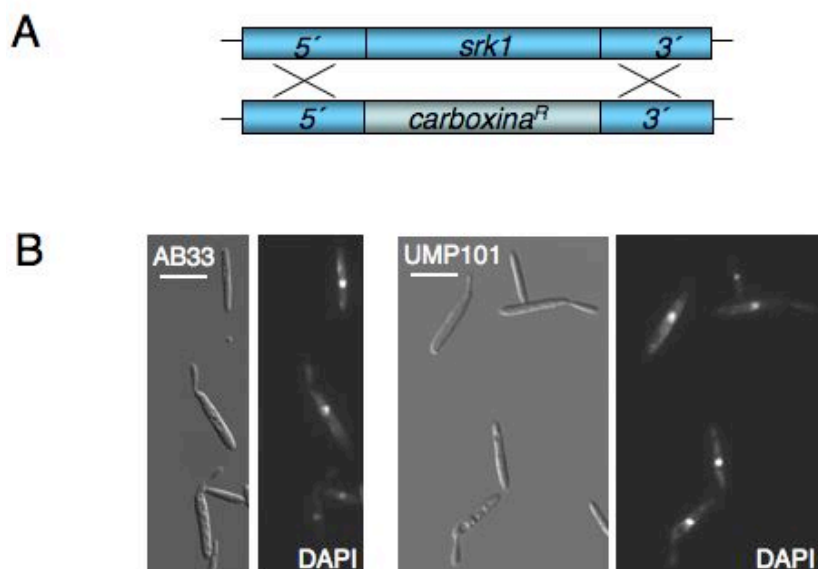


Figura 60. El gen *srk1* no es esencial. **A.** Esquema de la sustitución génica que se realizó para reemplazar el gen *srk1* por el gen de resistencia a carboxina. **B.** Las estirpes se crecieron en medio CMD durante 8 horas. Los septos se tiñeron con WGA y los núcleos con DAPI. Barra: 12 μm.

3. Análisis de la proteína Plk1

3.1 *U. maydis* tiene una proteína de la familia poloquinasa

Las proteínas poloquinasas actúan en distintos puntos de la transición G2/M como la entrada en mitosis, la maduración y separación de los centrosomas, la salida de mitosis, la formación de los septos y la citoquinesis, así como en procesos de control de daño a ADN y en los procesos de recuperación y adaptación (Nigg, 1998; Donaldson *et al.*, 2001; van Vugh y Medema, 2004; 2005). Como nuestro objetivo era caracterizar la regulación de la transición G2/M, decidimos estudiar la existencia y el posible papel de un regulador de la familia poloquinasa en *U. maydis*. Para ello realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia con proteínas del tipo poloquinasa y encontramos una única secuencia perteneciente a esta familia de proteínas. Esta secuencia que corresponde al marco de lectura abierto Um03234, presenta 2893 pares de bases con un intrón entre los nucleótidos +292 y +376 (considerando +1 la adenina del ATG). Denominamos a esta proteína Plk1 por analogía a las proteínas de *H. sapiens*.

El gen *plk1* codifica para una proteína de 935 aminoácidos con un peso molecular de 102,2 kDa. Como las otras proteínas de esta familia, Plk1 posee un dominio serin-treonin-quinasa en el extremo amino terminal y una región con dos *POLO_box* característicos en el extremo carboxilo terminal. El dominio quinasa presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 40-50% mientras que la región con los dos *POLO_box* presenta un porcentaje del 20-30% al ser comparados con los de otras proteínas de la familia. También se detecta un residuo T conservado en la posición 247 correspondiente a un putativo sitio de activación por fosforilación, un residuo K conservado en la posición 118 correspondiente a un residuo clave del putativo sitio de unión del ATP y tres posibles sitios de fosforilación por poloquinasas en la región carboxilo terminal, uno de ellos ubicado exactamente sobre una de las regiones *POLO_box* (Fig. 61 y Fig. 83 ANEXO 2).

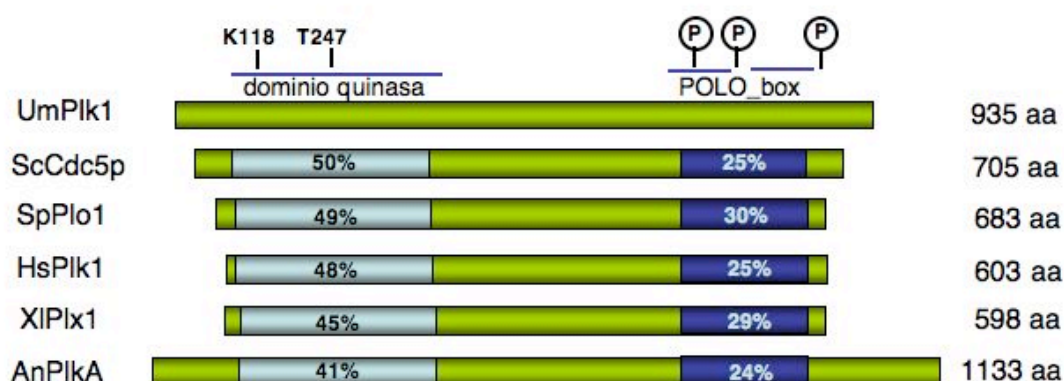


Figura 61. El gen *plk1* codifica una proteína tipo poloquinasa. Esquema de las proteínas de *Ustilago maydis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens*, *Xenopus laevis* y *Aspergillus nidulans* indicando el dominio quinasa, los dos *POLO_box* y los porcentajes de identidad de secuencia. También se muestran los residuos conservados K118 y T247 así como los posibles sitios de fosforilación por poloquinasas.

3.2 *plk1* es esencial en *U. maydis*

Para comenzar con el estudio del papel de esta proteína analizamos el efecto de la pérdida de función. Para ello se sustituyó la secuencia codificante de *plk1* por el marcador que confiere resistencia a higromicina. La interrupción sólo se pudo realizar en la estirpe diploide FBD11 (MUM21), indicando la posible

esencialidad del gen. Para analizarlo se estudió la progenie de la estirpe MUM21 tras la meiosis en medio con y sin selección. El hecho de no observar crecimiento en medio selectivo sugería que el gen era esencial.

Considerando estos resultados construimos la estirpe MUM22 donde se intercambió el promotor de *plk1* por el promotor *Pnar1* regulable por fuente de nitrógeno (FB1 *plk1^{nar1}*) (Fig. 62A y B). Para determinar la esencialidad del gen, analizamos el crecimiento en diluciones seriadas. La estirpe MUM22 no creció en condiciones restrictivas, mientras que lo hizo en forma similar al silvestre en condiciones permisivas (Fig. 62C).

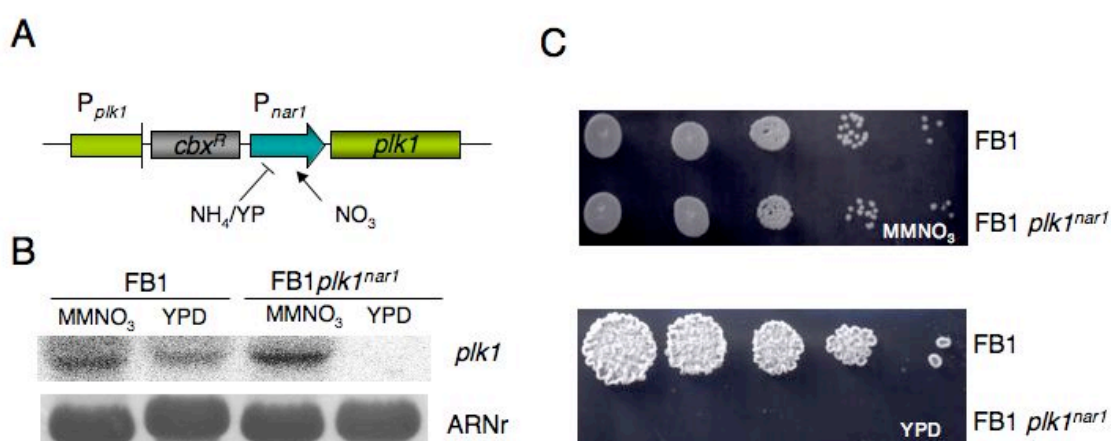


Figura 62. El gen *plk1* es esencial en *U. maydis*. **A.** Esquema de la construcción *plk1^{nar1}* con la que se reemplazó el promotor de *plk1* por el promotor *Pnar1*. **B.** Análisis de la expresión de ARNm por Northern blot. Ambas estirpes se cultivaron en MMNO₃, luego fueron transferidas y crecidas durante 6 horas en YPD (condición restrictiva) y MMNO₃ (condición permisiva). **D.** Ensayo de gotas. Las estirpes se crecieron en MMNO₃, luego se lavaron y se sembraron en diluciones seriadas en condiciones restrictivas y permisivas. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

3.3 Análisis de la expresión de *plk1* en el ciclo celular y en distintos medios de cultivo

A continuación se analizó la expresión de *plk1* en células acumuladas en la fase G1, S o M según se describió en Materiales y Métodos. La expresión del ARNm presentó niveles similares entre M y G1 mientras que disminuyó en la fase S (Fig. 63A).

Luego estudiamos la regulación transcripcional en distintos medios de cultivo (medio rico YPD, medio intermedio CMD y medio pobre MMNO₃). Se observó

un paulatino incremento de la señal a medida que se empobrecía el medio de cultivo (Fig. 63B).

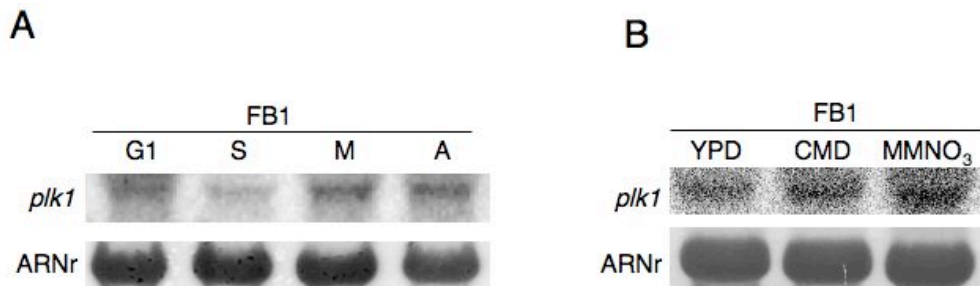


Figura 63. Análisis de la expresión de *plk1*. **A.** Northern blot de ARN obtenido de células acumuladas en las fases G1, S, M y en cultivo asincrónico A. **B.** Northern blot de ARN obtenido células crecidas en YPD, CMD y MMNO₃. Las muestras se recogieron tras 8 horas de cultivo.

3.4 Plk1 es necesaria para el paso G2/M

A continuación observamos la morfología, los núcleos y el contenido de ADN de la estirpe MUM22 cultivada en condiciones restrictivas (YPD) y permisivas (MMNO₃). Tras 6 horas de cultivo en YPD se observaron células con gemas alargadas y un único núcleo (Fig. 64A). Cuando observamos por FACS el contenido de ADN, se detectó una acumulación de células con contenido 2C en la estirpe MUM22 en condiciones restrictivas (Fig. 64B). Estos resultados sugerían una parada del ciclo celular en G2.

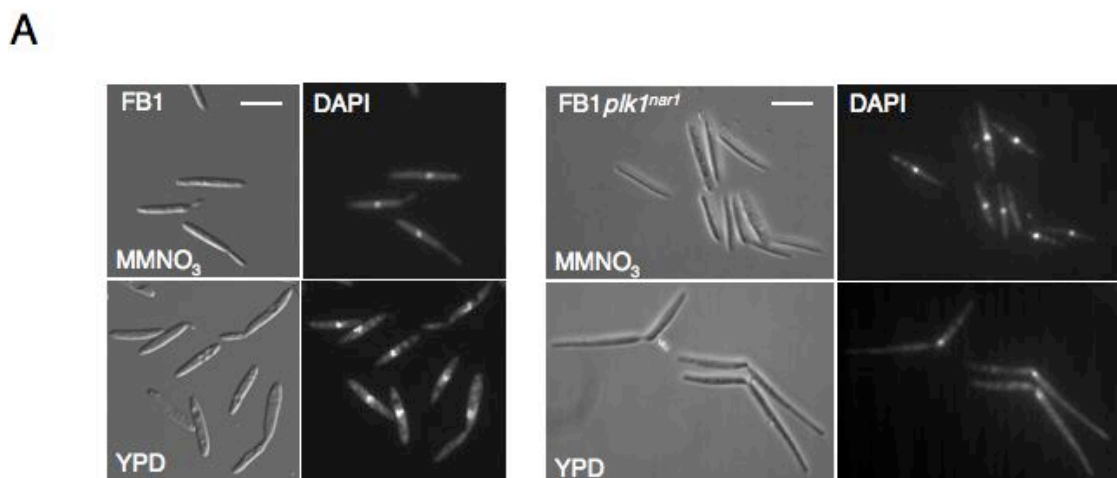


Figura 64. El apagado de *plk1* provoca una parada de ciclo en G2. **A.** Ver texto en la página siguiente.

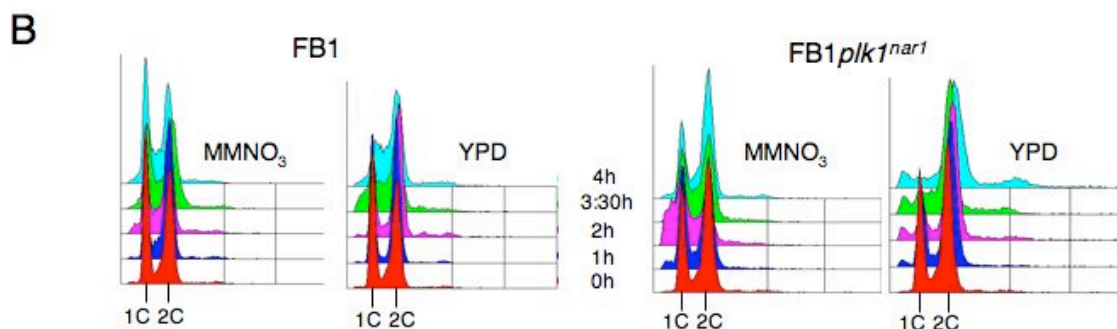


Figura 64. El apagado de *plk1* provoca una parada de ciclo en G2. **A.** Las estirpes FB1 y MUM22 se crecieron en MMNO₃, luego las células se lavaron, se transfirieron a MMNO₃ (condición permisiva) y medio YPD (condición restrictiva), tras 6 horas de cultivo se observó el fenotipo. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 12 μ m. **B.** Análisis de contenido de ADN de las estirpes FB1 y MUM22 crecidas en MMNO₃ y en YPD.

3.5 La parada en la fase G2 está relacionada con la fosforilación de Cdk1

En *U. maydis* se ha descrito que la quinasa Wee1 aumenta la fosforilación de Cdk1 produciendo una parada del ciclo celular en G2, mientras que la fosfatasa Cdc25 disminuye la fosforilación acelerando la entrada en mitosis (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b). En otros organismos, las poloquinasas pueden regular bien positivamente a Cdc25 (Qian *et al.*, 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002) o bien negativamente a Wee1 (Bartholomew *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004). Como el apagado del gen *cdc25* y la sobreexpresión de *wee1* presentan el mismo fenotipo que una estirpe MUM22 en YPD, decidimos analizar si Plk1 podría ser dispensable en condiciones en la que no hubiera fosforilación de Cdk1. Para ello utilizamos el alelo *cdk1^{AF}myc* que codifica una versión de Cdk1 no fosforilable y por lo tanto que no se inhibe por fosforilación inhibitoria (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a). El alelo *cdk1^{AF}myc* se colocó bajo el promotor regulable por fuente de carbono *PcrG1* en el fondo FB1 generando la estirpe MUM31 (Fig. 65A y B). En medio inductor, la estirpe MUM31 presentó un fenotipo típico de entrada rápido en mitosis caracterizado por células que tabican y que pueden presentar más de un núcleo por compartimento celular; sobre medio sólido creció igual que una silvestre (Fig. 65C y D). La estirpe control que sobreexpresaba el alelo *cdk1myc* creció siempre igual que la silvestre (Fig. 65C y D).

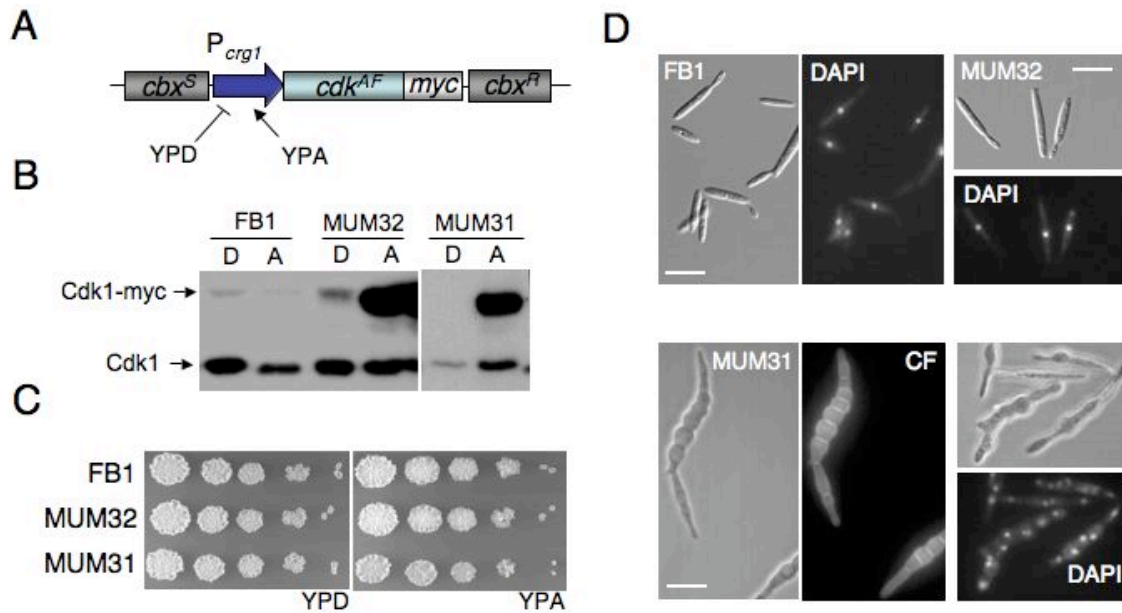


Figura 65. La sobreexpresión de Cdk1^{AF}myc produce una entrada rápida en mitosis. **A.** Esquema de la construcción que se utilizó para sobreexpresar el alelo integrado en el *locus* de la succinato deshidrogenasa. **B.** Western blot. de las estirpes FB1, MUM32 (FB1P_{cr_{g₁}cdk1myc) y MUM31 (FB1P_{cr_{g₁}cdk1^{AF}myc). Las muestras se recogieron tras 8 horas de cultivo. D: YPD (medio represor). A: YPA (medio inductor). **C.** Ensayo de gotas. Las estirpes se crecieron en YPD, luego se lavaron y se sembraron sobre YPD e YPA. **D.** Fenotipo de las estirpes tras 8 horas en YPA.}}

Luego se generó una estirpe en la cual se podía apagar la expresión de *plk1* y sobreexpresar el alelo *cdk1^{AF}myc* (MUM29). La estirpe MUM29 presentó un fenotipo de entrada rápida en mitosis en medio inductor de P_{cr_{g₁}cdk1^{AF}myc y permisivo para *plk1^{nar1}* (MMNO₃A) y de parada en fase G2 cuando se apagaron ambos promotores en YPD. En condiciones en las cuales se apagó *plk1* y se sobreexpresó *cdk1^{AF}myc*, se observaron células con un núcleo en la célula madre y otro en la gema, células con dos gemas pequeñas y sendos núcleos migrando desde la célula madre hacia las hijas, células sin gemas y células con el fenotipo de apagado de *plk1* (Fig 66A y C). La sobreexpresión del alelo *cdk1myc* no interfirió con el fenotipo de apagado de *plk1* en la estirpe MUM30 (Fig 66B y C).}

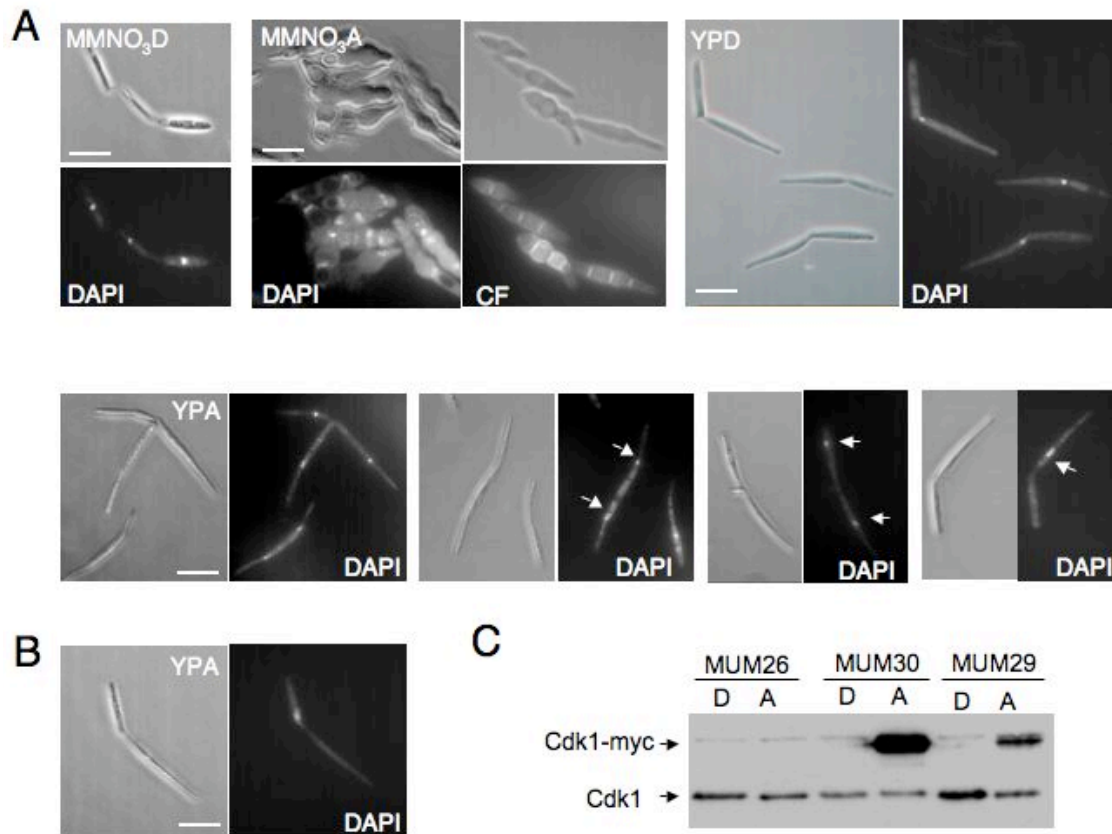


Figura 66. La parada en G2 está relacionada con Cdk1. **A.** La estirpe MUM29 (FB1 *plk1^{nar1} Pcr1cdk1^{AFmyc}*) fue crecida en MMNO₃ D y luego fue transferida a MMNO₃ D, MMNO₃ A, YPD e YPA. Se observó el fenotipo tras 9 horas de cultivo. En YPA, medio represor del promotor *Pnar1* e inductor del *Pcr1*, las flechas señalan los núcleos. **B.** La estirpe MUM30 (FB1 *plk1^{nar1} Pcr1cdk1myc*) tras 9 horas en medio YPA. En todos los casos, los núcleos se tiñeron con DAPI y los septos con calcoflúor. Barra: 10 μ m. **C.** Western blot de las estirpes MUM26 (*plk1^{nar1}*), MUM30 y MUM29. Las muestras se recogieron tras 9 horas de cultivo. D: YPD. A: YPA.

En diluciones seriadas, las estirpes MUM29 y MUM30 no crecieron en condiciones en las cuales se reprimía la expresión de *plk1^{nar1}* (Fig 67).

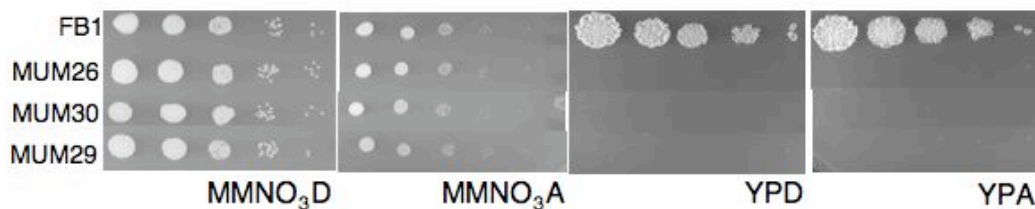


Figura 67. Ensayo de gotas. Las estirpes fueron crecidas en MMNO₃ D, luego se lavaron y se sembraron en diluciones seriadas sobre los distintos medios. La DO_{600nm} inicial se ajustó a 0,5. Las placas se incubaron a 28°C durante 48 horas. D: glucosa. A: arabinosa.

Estos resultados indicaban que sin fosforilación de Cdk1 ni expresión de *plk1*, se producía el paso a de G2 a M pero el ciclo celular no progresaba más allá de mitosis. Sugiriendo que el papel de Plk1 en la transición G2/M podría estar relacionada con la fosforilación de Cdk1, así como papeles adicionales de Plk1 en la regulación de la mitosis.

3.6 El papel de Plk1 en el paso G2/M puede estar relacionado con Wee1

Como Wee1 es la quinasa implicada en la fosforilación inhibitoria de Cdk1 en *U. maydis* (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a), y las poloquinasas pueden regular negativamente a quinasas de la familia Wee1 (Bartholomew *et al.*, 2001; Watanabe *et al.*, 2004) decidimos analizar la relación entre Plk1 y Wee1. Para ello utilizamos una estirpe en la cual éramos capaces de apagar simultáneamente la expresión de *wee1* y *plk1*. Para ello, se reemplazó el promotor del gen *wee1* por el promotor *Pnar1* en la estirpe MUM26 (*plk1^{nar1}*) generando la estirpe MUM28 (FB1*plk1^{nar1}wee1^{nar1}*) (Fig. 68A y B). La estirpe MUM28 no creció en diluciones seriadas en condiciones restrictivas para ambos genes (Fig. 68C).

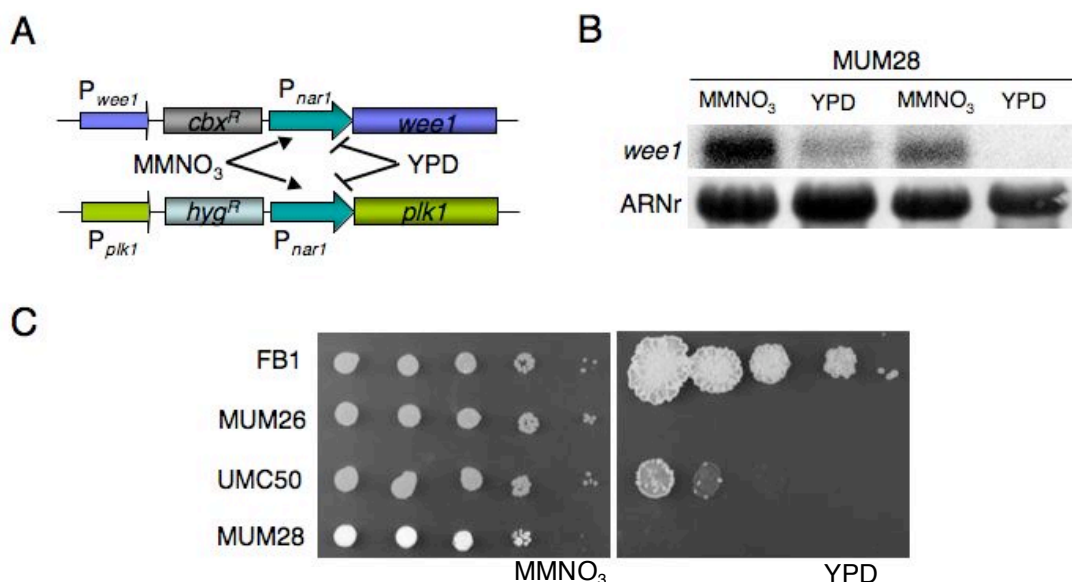


Figura 68. A. Esquema de las construcciones. Los promotores de ambos genes fueron reemplazados por el promotor *Pnar1*. B. Northern blot. La estirpe MUM28 (FB1*wee1^{nar1}plk1^{nar1}*) fue crecida en MMNO₃ y luego transferida a YPD (medio restrictivo) y MMNO₃ (medio permisivo). Las muestras se recogieron tras 8 horas de cultivo. C. Diluciones seriadas. Las estirpes UMC50 (FB1*wee1^{nar1}*), MUM26 (FB1*plk1^{nar1}*) y MUM28 se crecieron en condiciones permisivas, luego se lavaron y se sembraron sobre medio permisivo y restrictivo. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

Al analizar el fenotipo observamos que la estirpe FB1 *wee1^{nar1}* en condiciones restrictivas presentaba el fenotipo típico de entrada rápida en mitosis mientras que la estirpe MUM26 en medio restrictivo presentaba el fenotipo de parada del ciclo en G2. Cuando analizamos el fenotipo de la estirpe MUM28 en condiciones restrictivas para la expresión de ambos genes, se observaron células con un núcleo en la célula madre y otro en la gema, células con dos gemas pequeñas y sendos núcleos migrando desde la célula madre hacia las hijas, células sin gemas y células con el fenotipo MUM26 (Fig. 69).

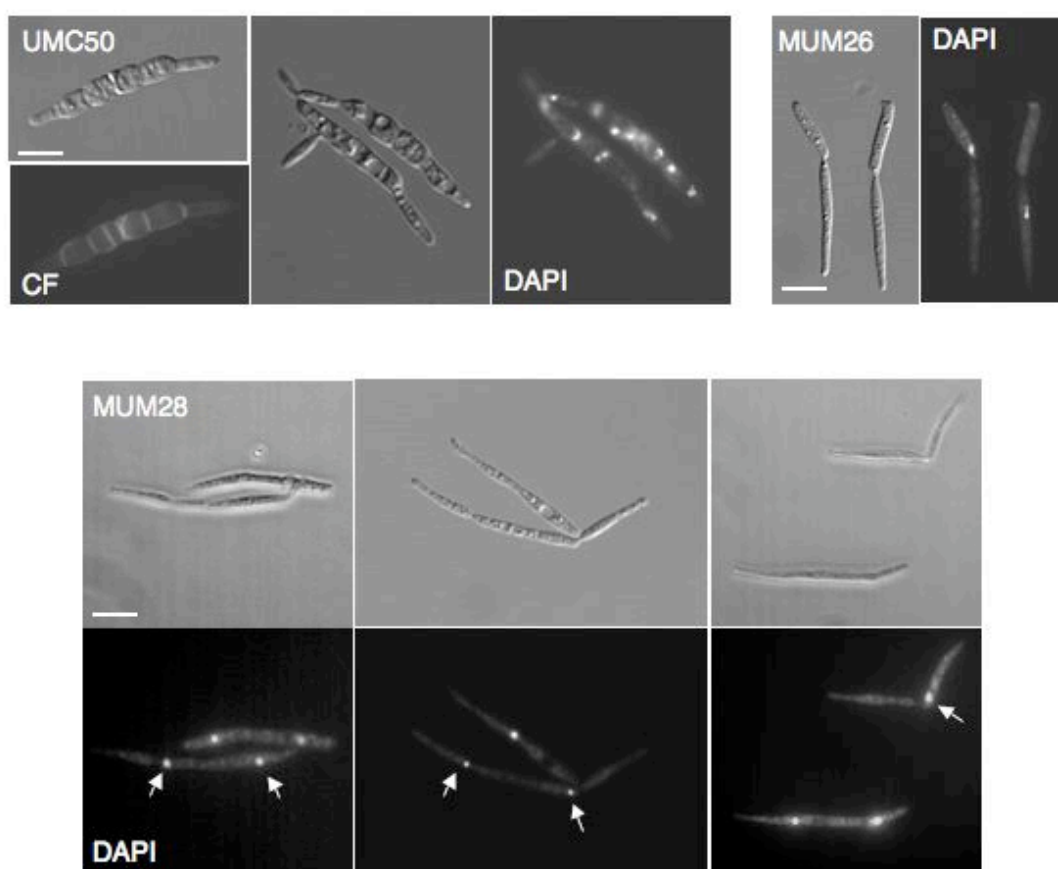


Figura 69. Análisis del fenotipo de la estirpe MUM28. Las estirpes UMC50 (FB1 *wee1^{nar1}*), MUM26 (FB1 *plk1^{nar1}*) y MUM28 (FB1 *wee1^{nar1} plk1^{nar1}*) fueron crecidas en medio permisivo y luego transferidas a medio restrictivo YPD. Se muestra el fenotipo tras 9 horas en YPD. Las flechas muestran los núcleos en la estirpe MUM28. Los septos se tiñeron con CF y los núcleos con DAPI. Barra: 10 μ m.

Éste era el mismo fenotipo observado en la estirpe MUM29. Lo cual era coherente, puesto que una situación donde la proteína Cdk1 no podía ser fosforilada equivalía a una situación en la cual se apagaba *wee1* sugiriendo que Plk1 podría estar actuando a nivel de Wee1.

3.7 La fosfatasa Cdc25 necesita a Plk1 para promover el paso G2/M

En *U. maydis*, la fosfatasa Cdc25 es la contrapartida de Wee1, de forma tal que revierte la fosforilación inhibitoria sobre Cdk1 promoviendo el paso a mitosis (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 b). Como en otros organismos se ha descrito que las poloquinasas pueden activar a Cdc25 y promover el paso a mitosis (Qian *et al.*, 2001; Toyoshima-Morimoto *et al.*, 2002) decidimos analizar la relación entre Plk1 y Cdc25. Para ello se expresó el alelo *cdc25myc* bajo el promotor *Pcrg1* en la estirpe MUM26 obteniendo la estirpe MUM27 (FB1*plk1^{nar1}* *Pcrg1cdc25myc*).

En diluciones seriadas se observó la estirpe MUM27 no crecía en condiciones restrictivas de la expresión de *plk1^{nar1}* (YPD e YPA) independientemente de la expresión de *Pcrg1cdc25myc* (YPA) (Fig 70).

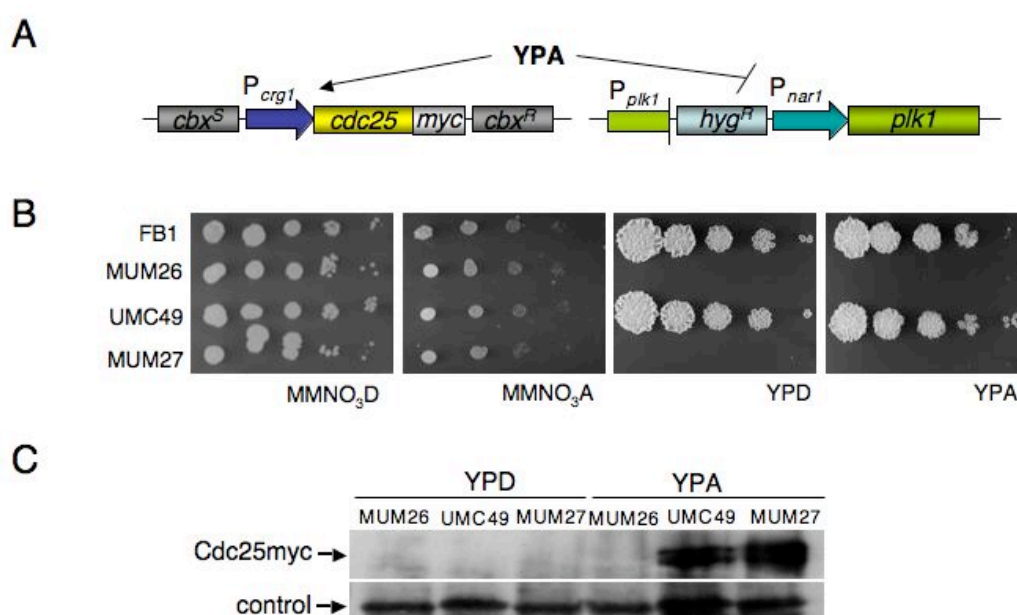


Figura 70. A. Esquema de las construcciones que se utilizaron para sobreexpresar el alelo *cdc25myc* integrado en el *locus* de la succinato deshidrogenasa y para reemplazar el promotor de *plk1* por el promotor *P_{nar1}*. **B.** Ensayo de gotas. Las estirpes MUM26 (FB1*plk1^{nar1}*), UMC49 (FB1*Pcrg1cdc25myc*) y MUM27 (FB1*plk1^{nar1}* *Pcrg1cdc25myc*) se crecieron en condiciones permisivas para *plk1^{nar1}* y de represión para *Pcrg1cdc25myc* (MMNO₃D). Luego se lavaron y se sembraron en diluciones seriadas en los distintos medios. **C.** Western blot. Las estirpes se crecieron 8 horas en YPA e YPD antes de recoger las muestras.

Al analizar la morfología y los núcleos de las células en medio líquido, la estirpe MUM27 presentó un fenotipo de entrada rápida en mitosis en medio inductor de *Pcrg1cdc25myc* y permisivo para *plk1^{nar1}* (MMNO₃A) y de parada en fase G2 cuando se apagaron ambos promotores en YPD. En condiciones en las cuales se apagó *plk1* y se sobreexpresó *cdc25* las células no fueron capaces de salir de la fase G2 (YPA) (Fig. 71).

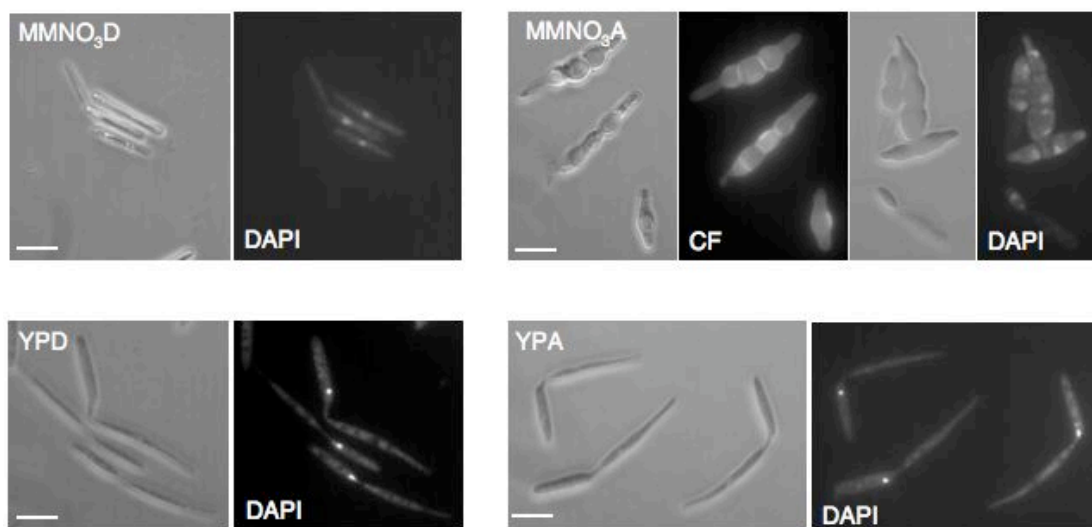


Figura 71. Plk1 es necesaria para la actividad de Cdc25. Las células de la estirpe MUM27 fueron crecidas en MMNO₃D, luego fueron transferidas a los distintos medios. El fenotipo se observó tras 9 horas de cultivo. Los núcleos se tiñeron con DAPI y los septos con CF. Barra: 10 μ m.

Estos resultados sugerían que Plk1 era necesaria para que Cdc25 promueva el paso de G2/M.

3.8 La sobreexpresión de la proteína completa o del dominio polo no es suficiente para alterar el ciclo celular de *U. maydis*

A continuación se estudió el efecto de la sobreexpresión de Plk1 sobre el ciclo celular de *U. maydis*. Para ello se construyó la estirpe MUM33 donde se integró la proteína fusionada a un epítipo HA al *locus* de la succinato deshidrogenasa. La expresión del alelo *plk1HA* estaba regulada por el promotor *Pcrg1*, inducible en medio con arabinosa y reprimible en medio con glucosa (Fig. 72A y B). Se comprobó la funcionalidad de la construcción expresándola en el fondo genético MUM26, generando la estirpe MUM23. Se observó una complementación parcial del fenotipo de apagado de *plk1* (Fig. 72B, C y D).

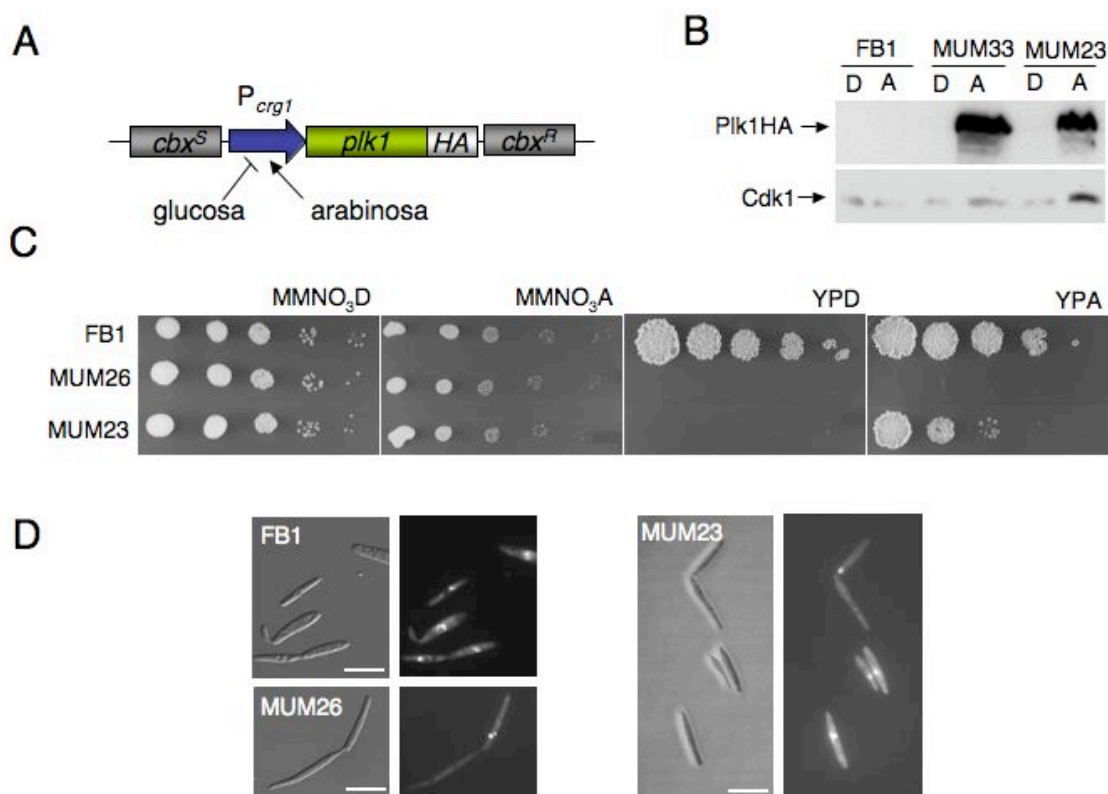


Figura 72. La sobreexpresión del alelo *plk1HA* es funcional. **A.** Esquema de la construcción que se utilizó para sobreexpresar el alelo. **B.** Western blot de las estirpes FB1, MUM33 (FB1 *Pcrg1plk1HA*) y MUM23 (FB1 *plk1^{nar1} Pcrg1plkHA*) en condiciones de inducción (YPA: A) y represión (YPD: D) del promotor *Pcrg1*. **C.** Ensayo de gotas. Las estirpes FB1, MUM26 (FB1 *plk1^{nar1}*) y MUM23 fueron crecidas en MMNO₃D y luego se sembraron en diluciones seriadas en los distintos medios. La concentración inicial se ajustó a DO_{600nm} de 0,5. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C. **D.** Fenotipo de las estirpes tras 8 horas en YPD. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 12 μ m.

Al analizar el crecimiento de la estirpe MUM33 no se observó efecto ni en medio líquido ni en medio sólido inductor (Fig. 73).

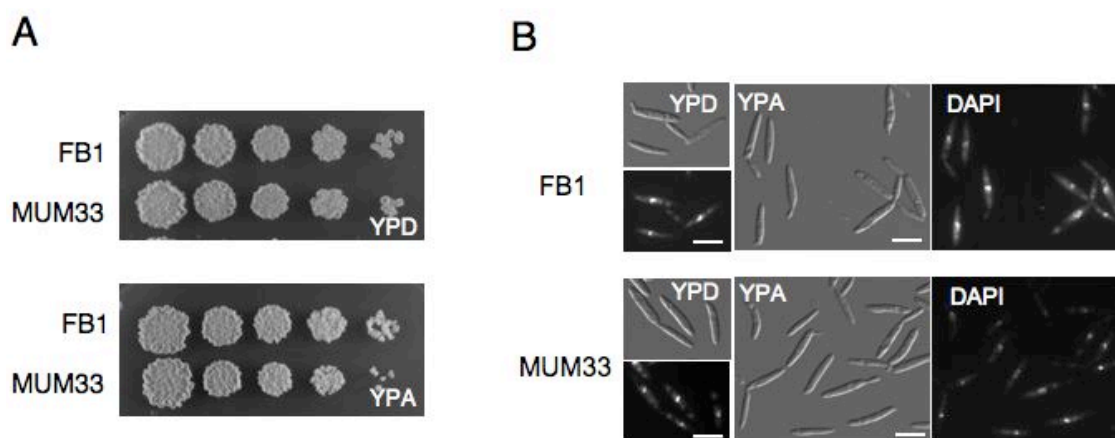


Figura 73. La sobreexpresión de *plk1HA* no afecta el fenotipo. Ver texto en la página siguiente.

Figura 73. La sobreexpresión de *plk1HA* no afecta el fenotipo. **A.** Diluciones seriadas de las estirpes FB1 y MUM33 (FB1*Pcrg1plk1HA*) sobre medio sólido inductor (YPA) y represor (YPD). Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C. **B.** Fenotipo de las estirpes tras 10 horas en medio inductor y represor. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 10 μ m.

Puesto que en otros organismos la expresión del dominio polo puede producir efectos parecidos a la pérdida de función (Jang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004), analizamos el efecto de la sobreexpresión de esta región en *U. maydis*. Con este fin se construyó la estirpe MUM59 que expresaba un fragmento de la quinasa Plk1 desde el aminoácido 353 hasta el final de la proteína (61 kDa) con el epítipo T7 fusionado al extremo amino terminal. Este alelo correspondía a la región central de la proteína más la región con los dos *POLO_box* y se expresó desde el *locus* de la succinato deshidrogenasa bajo la regulación del promotor *Pcrg1*. Comprobamos que la estirpe MUM59 expresaba esta versión de la proteína en condiciones de inducción y observamos que no presentaba diferencias con la silvestre ni en medio sólido ni en medio líquido inductor (Fig. 74).

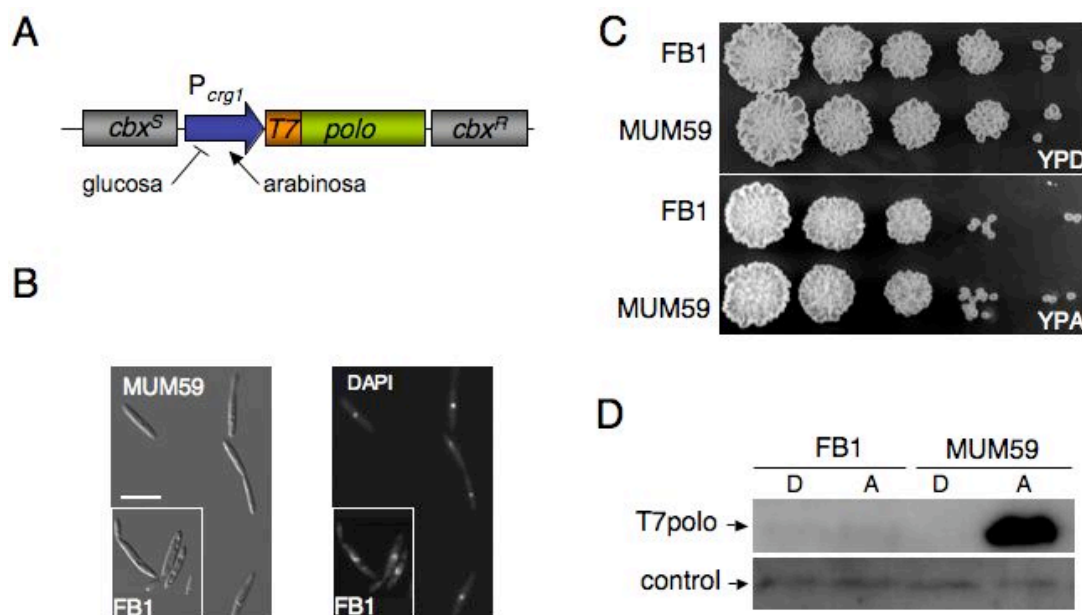


Figura 74. La sobreexpresión del dominio polo no modifica el fenotipo silvestre. **A.** Esquema de la construcción que se utilizó para sobreexpresar el alelo *T7polo*. **B.** Fenotipo de las estirpes FB1 y MUM59 (FB1 *Pcrg1T7polobox*) tras 10 horas en medio represor (YPD) e inductor (YPA). Los núcleos se tiñeron con DAPI. Barra: 12 μ m. **C.** Diluciones seriadas de las estirpes FB1 y MUM59 sobre medio represor e inductor. **D.** Western blot. Las muestras se recogieron tras 10 horas de cultivo en YPD (D) e YPA (A).

4. Análisis de la proteína Hsl1

4.1 *U. maydis* tiene una quinasa tipo Nim1/Cdr1

Como se menciona en la introducción, las serin-treonin quinasas tipo Nim1 actúan como reguladores de la longitud de la fase G2 puesto que regulan negativamente a quinasas de la familia Wee1 (Wu *et al.*, 1996; Barral *et al.*, 2002). Estas proteínas están involucradas en la adaptación del ciclo celular en respuesta a señales nutricionales en *S. pombe* (Belenguer *et al.*, 1997) y en el control de morfogénesis en *S. cerevisiae* (Barral *et al.*, 1999; McMillan *et al.*, 1999; Hanrahan y Snyder, 2003). Decidimos estudiar la presencia y el papel de un regulador de este tipo en el ciclo celular de *Ustilago maydis*. Para ello realizamos una búsqueda *in silico* por similitud de secuencia y encontramos una única proteína del tipo Hsl1 *U. maydis*. Esta secuencia presenta 3816 pares de bases con un intrón entre los nucleótidos +606 y +700 (considerando +1 a la adenina del ATG) y corresponde al marco de lectura abierto Um03928. Denominamos a esta proteína Hsl1 por analogía a la proteína Hsl1p de *S. cerevisiae*.

El gen *hsl1* codifica para una proteína de 1239 aminoácidos con un peso molecular de 133,2 kDa. Como las otras proteínas de esta familia posee un dominio serin-treonin-quinasa en el extremo amino terminal. El dominio quinasa presenta un porcentaje de identidad de secuencia del 40-50% con proteínas de *S. cerevisiae* pertenecientes a esta familia de quinasas, como Gin1p, Kcc4p y Hsl1p y con Hsl1 de *Candida albicans*. Mientras que con las homólogas de *S. pombe*, Cdr1 y Cdr2, presenta sólo un 35% de identidad de secuencia en el dominio quinasa (Fig. 75 y Fig. 84 ANEXO 2).

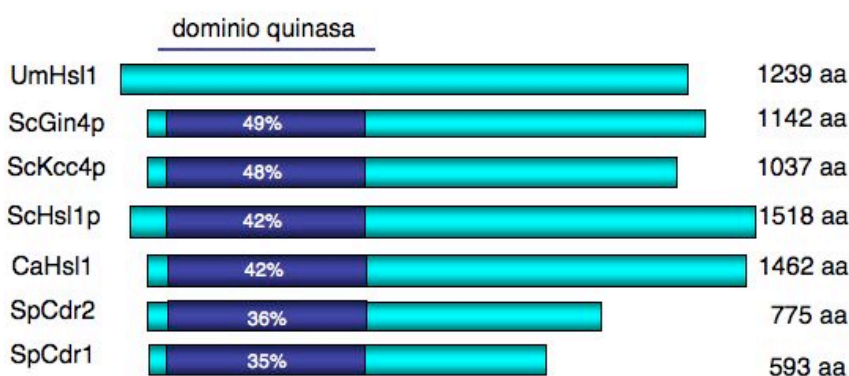


Figura 75. El gen *hsl1* codifica una proteína tipo Nim1/Cdr1. Esquema de las proteínas de *U. maydis*, *C. albicans*, *S. pombe* y *S. cerevisiae* indicando el dominio quinasa y los porcentajes de identidad.

4.2 *hsl1* no es esencial en *U. maydis*

Comenzamos el estudio de esta proteína analizando la pérdida de función. Para ello se reemplazó el marco de lectura abierto de *hsl1* por el gen que confiere resistencia a higromicina generando la estirpe FB1 Δ *hsl1* (MUM1). El crecimiento de la estirpe MUM1 en diluciones seriadas no presentó diferencias con respecto a la silvestre (Fig. 76).

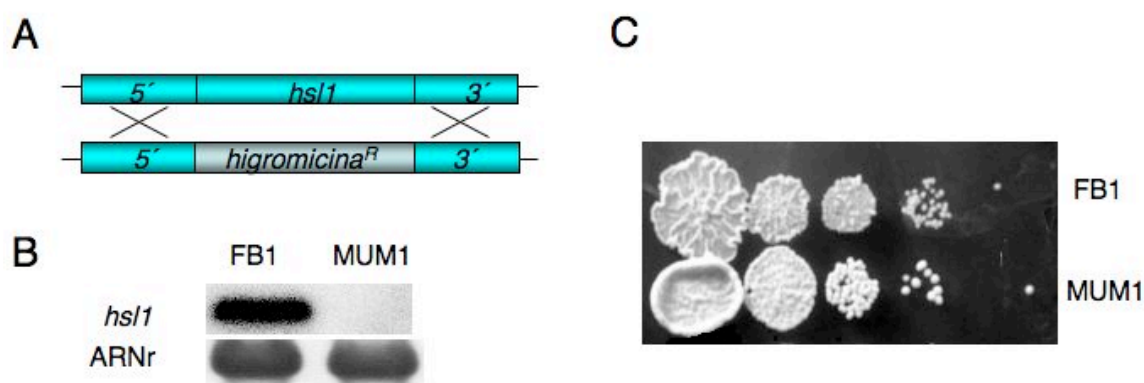


Figura 76. El gen *hsl1* no es esencial. **A.** Esquema de la sustitución génica con la que se reemplazó el gen *hsl1* por el gen de resistencia a higromicina. **B.** Northern blot de ARN obtenido de células de las estirpes FB1 y MUM1 (FB1 Δ *hsl1*) crecidas durante 8 horas en medio YPD. **C.** Diluciones seriadas de las estirpes sobre medio YPD. La DO_{600nm} inicial se ajustó a 0,5. Las placas se incubaron durante 48 horas a 28°C.

4.3 La proteína Hsl1 afecta el tamaño y la separación celular

Cuando se analizó el crecimiento en cultivo líquido se observaron células con mayor longitud celular que las silvestres y células que no separaban y presentaban cadenas de entre 4-6 células. Cada célula presentaba un único núcleo (Fig. 77).

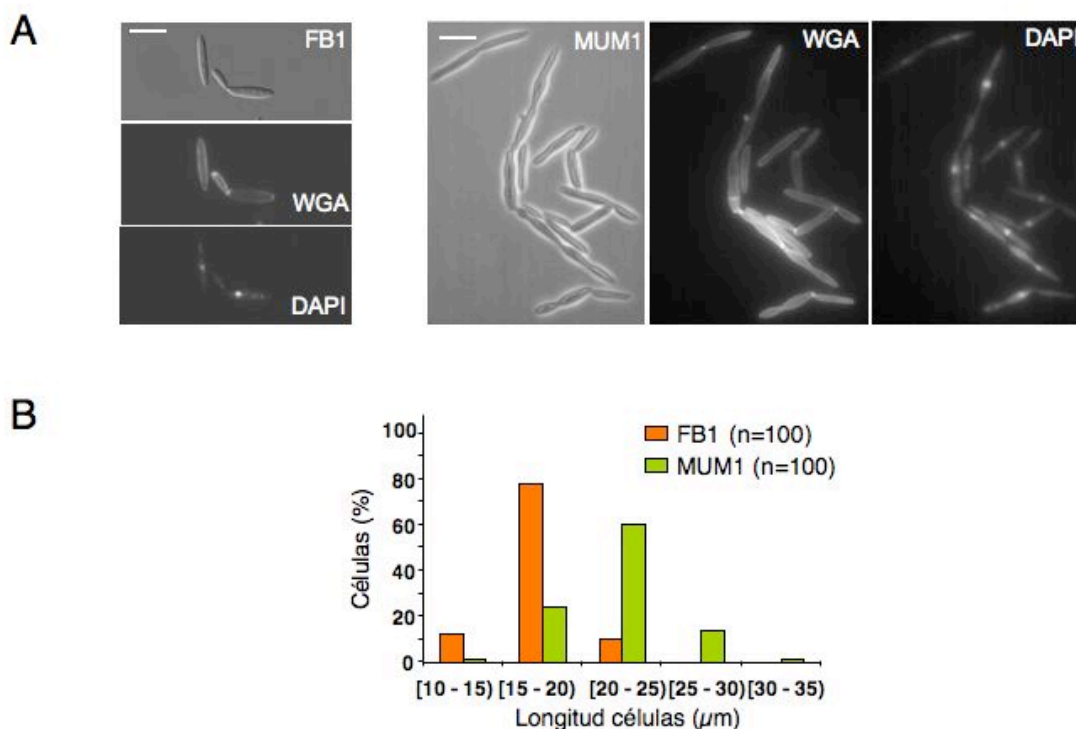


Figura 77. Hsl1 afecta el tamaño y la separación celular. A. Fenotipo de las estirpes FB1 y MUM1 tras 8 horas de cultivo en YPD. Los septos se tiñeron con WGA y los núcleos con DAPI. Barra: 10 μm . **B.** Gráfico del porcentaje de células en función del tamaño celular. En naranja se muestra la estirpe FB1 y en verde la estirpe MUM1. Se midieron 100 células de cada estirpe y se utilizaron intervalos de 5 μm para agrupar los tamaños celulares. Las estirpes fueron crecidas en medio YPD durante 8 horas y luego fueron fotografiadas para realizar las mediciones de longitud celular.

4.4 Hsl1 en la adaptación a distintas condiciones nutricionales

Se ha descrito que algunas proteínas de esta familia están involucradas en la adaptación a distintas condiciones nutricionales (Berenguer *et al.*, 1997), por lo tanto decidimos analizar la expresión de *hsl1* en distintos medios. Se detectó mayor expresión del mensajero de *hsl1* en medio de cultivo pobre (MMNO_3) que intermedio y rico (CMD e YPD) (Fig. 78A).

A continuación se analizó el contenido de ADN de las células de MUM1 y FB1 tras 8 horas en MMNO_3 (medio pobre), CMD (medio intermedio) y en YPD (medio rico). La estirpe silvestre presentó un típico patrón de adaptación al medio donde se acumularon células con contenido de ADN 1C en medio mínimo, mientras que en medios más ricos acumularon con contenido 2C. Sin embargo, la estirpe MUM1 presentó un perfil de acumulación de células con

contenido de ADN 2C en todas las condiciones analizadas (Fig. 78B). Estos resultados sugerían que la estirpe MUM1 no era capaz de adaptarse a las distintas condiciones nutricionales.

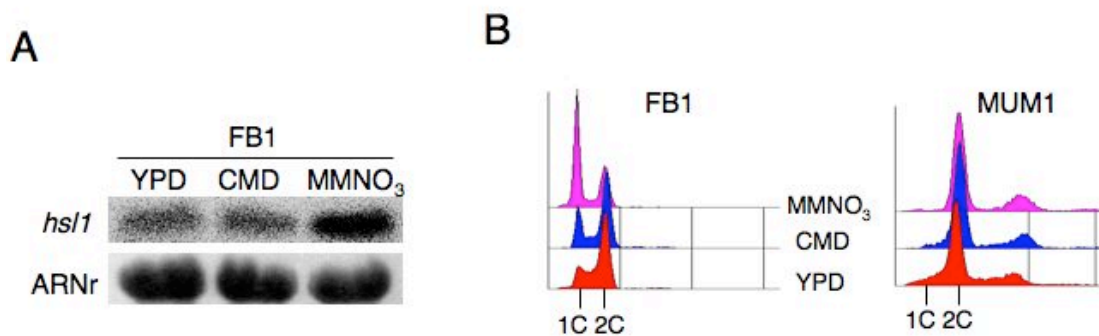


Figura 78. Hsl1 en la adaptación nutricional. **A.** Northern blot realizado con ARN extraído de células de FB1 crecidas durante 8 horas en medio YPD, CMD y MMNO₃. **B.** Análisis de contenido de ADN de células de las estirpes FB1 y MUM1 cultivadas durante 8 horas en medio YPD, CMD y MMNO₃.

Discusión

Como hemos mencionado en la introducción, la inducción del programa de virulencia implica un cambio en la forma de crecimiento y una parada del ciclo celular cuidadosamente regulada. Por ello *U. maydis* es un modelo interesante para estudiar la relación entre ciclo celular, morfología y patogénesis. En este trabajo se ha abordado el estudio del mecanismo responsable de la parada del ciclo celular que se observa cuando se induce el factor de transcripción b, un regulador maestro de virulencia en *U. maydis*. Dentro de este abordaje también se han caracterizado nuevos reguladores de ciclo del ciclo celular.

Reguladores de G2/M en *U. maydis*

Estudios anteriores han sugerido que la regulación de la transición G2/M es fundamental cuando se forma el filamento infectivo de *U. maydis* (Sgarlata, 2005). En un ciclo celular normal, esta transición es regulada principalmente por fosforilación inhibitoria del complejo Cdk1/Clb2, siendo Wee1 y Cdc25 las proteínas asociadas a la regulación de la fosforilación (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b), aunque poco sabemos sobre la regulación de la quinasa y la fosfatasa en *U. maydis*. Para comprender la parada de ciclo que ocurre en el filamento infectivo hemos caracterizado posibles reguladores de Wee1 y Cdc25. Para ello, se han buscado y estudiado tres proteínas que en otros organismos son conocidos reguladores de la quinasa y de la fosfatasa, una proteína de la familia 14-3-3, una de la familia de poloquinasas y una de la familia Nim1/Cdr1.

La proteína Bmh1

A diferencia de las otras levaduras modelo de estudio como *S. pombe* y *S. cerevisiae*, *U. maydis* posee una sola proteína de esta familia a la que nombramos Bmh1, codificada por un gen esencial. Esta proteína parece implicada en varios procesos, entre ellos, la regulación de transición G2/M puesto que el apagado de *bmh1* provoca una entrada rápida en mitosis. En otros organismos el papel de proteínas 14-3-3 en la transición G2/M se ha vinculado a la regulación de la localización de Cdc25 (Darling *et al.*, 2005;

Hermeking y Benzinger, 2006; van Exuden y Stennsa, 2006). Según estos modelos, las proteínas 14-3-3, a través del reconocimiento de motivos fosforilados sobre Cdc25, son capaces de modificar la localización celular de la fosfatasa, reteniéndola en el citoplasma. Como el fenotipo de apagado de *bmh1* recordaba al fenotipo de sobreexpresión de *cdc25*, caracterizado por células que tabican y que pueden presentar más de un núcleo (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005b), decidimos estudiar la relación de estas proteínas en *U. maydis*. El análisis de interacción genética sugería que Bmh1 podría ser un regulador negativo de Cdc25, así como los estudios de localización celular sugerían que Bmh1 podría modificar la localización de Cdc25. Con estos resultados, estudiamos la interacción entre las proteínas. Para ello se modificaron en Cdc25 posibles sitios de reconocimiento por Bmh1. Las modificaciones introducidas interfirieron la interacción de las proteínas y provocaron una entrada no regulada en mitosis, sugiriendo que como en mamíferos y *S. pombe*, Bmh1 podría ser un regulador negativo de Cdc25. El fenotipo de la versión no fosforilable de Cdc25 era más sutil que el apagado de *bmh1*, caracterizado por células pequeñas que acumulaban contenido de ADN en 1C. Estas observaciones se relacionan con un paso rápido de G2/M, puesto que un paso acelerado por la fase G2 provoca células más pequeñas que luego compensan su tamaño en la fase G1 (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b). El hecho de no observar fenotipos similares entre la estirpe donde apagamos *bmh1* y la estirpe que posee la versión Cdc25^{AAA} sugiere la existencia de otros sitios de fosforilación reconocidos por Bmh1 así como que Bmh1 podría estar implicado en otros procesos. Las proteínas 14-3-3 reconocen proteínas muy variadas implicadas en numerosos procesos celulares. Se ha propuesto que son capaces de regular a Wee1 uniéndose a la quinasa y estabilizándola (Perry y Kornblut, 2007), por lo que el papel de Bmh1 en la transición G2/M también podría implicar la regulación de otros elementos del ciclo celular, como Wee1. Igual que en otros organismos, como *S. pombe* y metazoos, donde se ha descrito este mecanismo, la regulación de Cdc25 por Bmh1 podría estar implicada en el punto de control de daño a ADN (Peng *et al.*, 1997; Sanchez *et al.*, 1997; López-Girona *et al.*, 1998; Karlsson-Rosenthal y Millar, 2006). Hemos

observado que tanto el apagado de *bmh1* como la expresión de la versión Cdc25^{AAA} produce células sensibles al daño producido por luz UV. Las diferencias observadas en cuanto a la sensibilidad (el apagado de *bmh1* producía un fenotipo más sensible que la versión Cdc25^{AAA}) podían deberse a la existencia de otros sitios de reconocimiento entre las proteínas o a otros papeles de Bmh1 en el control del daño a ADN.

Siguiendo con el modelo mencionado anteriormente, se han descrito distintas quinasas capaces de fosforilar a Cdc25 creando los sitios de reconocimiento para proteínas 14-3-3, de forma que la retención de la fosfatasa en el citoplasma provoca el retraso del ciclo celular en G2. Como se mencionó en la introducción entre estas quinasas se encuentran proteínas activadas por el control de daño a ADN como Chk1 (Sanchez *et al.*, 1997; López-Girona *et al.*, 1998), quinasas activadas por la ruta p38/MAPK también en respuesta a daño a ADN como MK2 (Manke *et al.*, 2005) y quinasas de esta misma familia activadas por estrés osmótico como Srk1 (López-Avilés *et al.*, 2005). También se ha descrito una quinasa asociada a Cdc25 denominada C-TAK1 que aunque no ha sido vinculada a situaciones de estrés, actúa sobre Cdc25 a través del mismo mecanismo. Se ha sugerido que podría regular la actividad de la fosfatasa en la interfase (Peng *et al.*, 1998).

En *U. maydis* hemos encontrado quinasas que corresponden a los tres tipos anteriores y las hemos denominado Chk1, Srk1 y Par1. Si bien aún no hemos caracterizado completamente el papel de estas proteínas, hemos observado que Chk1 está involucrada en el control de daño a ADN puesto que estirpes deficientes en Chk1 fueron sensibles a tratamientos con luz UV. Esta proteína podría estar relacionada con el control de daño a ADN junto con Bmh1 y Cdc25. Sin embargo aún no hemos demostrado que esta quinasa fosforile a Cdc25 en respuesta a daño por UV aunque sí observamos que la anulación de putativos sitios de fosforilación sobre la fosfatasa afecta la interacción con Bmh1 y provoca sensibilidad a luz UV.

Una proteína poloquinasa

Otra familia de reguladores de la transición G2/M son las poloquinasas. *U. maydis* posee una proteína de esta familia, a la que hemos nombrado Plk1, codificada por un gen esencial. A diferencia de las dos levaduras modelo de estudio, *S. pombe* y *S. cerevisiae*, donde los homólogos están involucrados en la progresión dentro de la mitosis (Ohkura *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997), en *U. maydis* Plk1 parece tener un papel fundamental en la transición G2/M, puesto que la ausencia de Plk1 detienen el ciclo celular en G2. Por otra parte, Plk1 también parece tener funciones adicionales en mitosis, puesto que cuando se supera la parada en G2 impuesta por la fosforilación inhibitoria de Cdk1, la ausencia de Plk1 afecta eventos posteriores en el ciclo celular.

El papel de Plk1 en la transición G2/M recuerda al papel de estas quinasas en mamíferos y en *X. laevis*, donde está implicada en la iniciación de la mitosis a través de la activación del complejo CDK/Ciclina B, de Cdc25 y/o de Wee1 (van Vugt y Medema, 2005). En *U. maydis* hemos observado que la ausencia de Plk1 produce el mismo fenotipo que la ausencia de Cdc25 (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005b), es decir, células con gemas alargadas y una parada del ciclo celular en G2. En este trabajo hemos observado que, de acuerdo con un posible papel de regulador positivo de Cdc25, Plk1 es necesaria para la actividad de Cdc25. Aún así, considerando que en ausencia de Wee1, la ausencia de Plk1 permite la progresión del ciclo más allá de la transición G2/M, no podemos descartar alguna regulación sobre Wee1.

Es interesante destacar que ni la sobreexpresión de Plk1 ni del dominio polo afecta el ciclo celular. Se ha descrito que el dominio polo podría actuar como un módulo de regulación de la actividad catalítica así como un “localizador” de los sustratos (Jang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Lowrey *et al.*, 2004). Por ello, la sobreexpresión del dominio polo puede producir efectos similares a la pérdida de función. Sin embargo, el hecho de no observar esta situación en *U. maydis* sugeriría que el dominio polo no es suficiente para reconocer el sustrato o el dominio catalítico. Esta posibilidad podría implicar una forma de inhibición intermolecular dependiente de la proteína entera.

Una proteína de la familia Nim1/Cdr1

Las proteínas de la familia Nim1/Cdr1 también son conocidos reguladores de la transición G2/M que actúan sobre quinasas de la familia Wee1, ya sea directamente como en *S. pombe* (Parker *et al.*, 1993) o indirectamente como en *S. cerevisiae* en el control del morfogénesis (Barral *et al.*, 1999; Hanrahan y Snyder, 2003). Hemos caracterizado una quinasa de esta familia en *U. maydis* a la que hemos denominado Hsl1. Esta proteína no parece tener un papel determinante en la regulación del ciclo celular, sin embargo podría estar implicada en la regulación de la duración de la fase G2, puesto que la ausencia de Hsl1 produce células alargadas. Como la concentración del crecimiento polar en *U. maydis* ocurre en G2 (Steinberg *et al.*, 2001), un retraso en esta fase es compatible con la presencia de células largas. No hemos encontrado evidencias que sugieran que esta regulación ocurre a través de Wee1 aunque sabemos que esta quinasa está implicada en el control de tamaño celular (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a).

Por otra parte, el efecto en el tamaño y en la separación celular podrían deberse a un tipo de regulación similar a la de *S. cerevisiae* (Barral *et al.*, 1999; Cid *et al.*, 2001; Hanrahan y Snyder, 2003). En este escenario, podríamos pensar que Hsl1 podría estar controlando el ensamblado de elementos del citoesqueleto. La falta de Hsl1 podría retrasar ese proceso, produciendo células más largas. En esta situación, debería existir un sistema alternativo, que con el tiempo permita que las células se separen y entren en otra ronda de ciclo celular. Hsl1 podría “medir” el tamaño celular a través del ensamblado del citoesqueleto y relacionar eventos nucleares con el crecimiento celular.

También hemos observado que Hsl1 influye en la adaptación a condiciones nutricionales. Otras quinasas de esta familia, como Nim1 de *S. pombe* también han sido involucradas en la adaptación a cambios nutricionales, aunque proponen que la proteína no participa activamente del proceso de adaptación (Berenguer *et al.*, 1997). En *U. maydis*, la falta de Hsl1 impediría que las células permanezcan más tiempo en G1 en condiciones nutricionales pobres, adaptación típica de *U. maydis* (Castillo-Lluva *et al.*, 2004). Sin embargo no

podemos descartar que esta observación sea una consecuencia de la falta de regulación de la fase G2.

Regulación del ciclo celular en el proceso patogénico

A lo largo de este trabajo se ha comentado la importancia de la coordinación entre el ciclo celular y el cambio en la forma de crecimiento. En *U. maydis* el cambio en la forma de crecimiento está íntimamente relacionado con el proceso infectivo e implica además un proceso de reconocimiento sexual (Banuett, 1995). Una de las primeras estructuras que se observan cuando se inicia el programa patogénico es el filamento infectivo caracterizado por presentar un crecimiento fuertemente polar y dos únicos núcleos que no se dividen, provenientes de las células que se aparearon (Snetselaar y Mims, 1992). Si estos dos núcleos poseen alelos compatibles para el *locus b*, se formará el factor de transcripción b (Gillisen *et al.*, 1992; Kämper *et al.*, 1995). Como hemos comentado en la introducción, el crecimiento en forma de filamento, el establecimiento del dicarionte y los eventos patogénicos posteriores al apareamiento, están regulados por esta proteína (Bölker *et al.*, 1995; Feldbrügge *et al.*, 2004). También se ha comentado que la regulación del ciclo celular debe ser muy estricta para garantizar el éxito del proceso infectivo (Pérez-Martín *et al.*, 2006). Por estos motivos, nos propusimos caracterizar la parada del ciclo celular observada en el filamento infectivo.

De acuerdo con estudios anteriores (Sgarlata, 2005), demostramos que la parada del ciclo celular en el filamento infectivo ocurre en la fase G2 y que depende del factor de transcripción b. Sin embargo, al analizar los niveles de ARNm y de proteína de los de las principales reguladores implicados en la regulación de la transición G2/M, Clb1, Clb2 y Cdk1 (García-Muse *et al.*, 2004), sólo los niveles de *clb1* se modificaron y esta modificación no parecía determinar la parada del ciclo celular.

Luego, utilizando una versión de la quinasa Cdk1 refractaria a la fosforilación inhibitoria, hemos observado que la fosforilación de Cdk1 es fundamental para regular la parada de ciclo inducida en el filamento infectivo. Ahora bien, ¿cómo

es regulada la fosforilación de Cdk1 en este proceso? ¿Cómo se transmite la señal de parada de ciclo desde el factor de transcripción *b* hasta Cdk1?

Sólo en los casos donde se afectó directamente la fosforilación de Cdk1, se observó un efecto marcado sobre la parada de ciclo celular. Tanto el apagado de *wee1* como la sobreexpresión de *cdc25*, los principales reguladores de la fosforilación de Cdk1 descritos en *U. maydis* (Sgarlata y Pérez-Martín, 2005 a y b), afectan la parada del ciclo celular que ocurre en el filamento infectivo. Sin embargo, la regulación transcripcional de estos reguladores no se modifica mucho durante la inducción de la formación del filamento infectivo y el cambio del promotor de *wee1* por uno heterólogo débil no produce grandes cambios sobre la regulación del ciclo celular (Sgarlata, 2005). Estos resultados sugerían que la regulación podría ocurrir a nivel de las proteínas. Por otra parte, el hecho de que la sobreexpresión de *cdc25* fuera suficiente para activar parcialmente el ciclo, nos sugirió que en este caso los altos niveles de la fosfatasa podrían estar saturando un posible regulador negativo y así promoviendo la progresión del ciclo celular.

Para analizar esta posibilidad, estudiamos un regulador negativo de Cdc25, Bmh1. Cuando analizamos el papel de la versión Cdc25^{AAA} en la inducción del filamento infectivo, observamos una activación parcial del ciclo celular sugiriendo que la interacción entre Bmh1 y Cdc25 podría estar implicada en la parada del ciclo celular. El hecho de que la falta de Bmh1 afecte tanto a la inducción del filamento infectivo como a la parada de ciclo sugiere que Bmh1 podría estar implicado en la regulación de otras proteínas que también están implicadas en el proceso.

Si la interacción entre Bmh1 y Cdc25 era un mecanismo involucrado en la regulación de la parada del ciclo celular, entonces deberían existir quinasas que crearan los sitios de reconocimiento entre Bmh1 y Cdc25. En este escenario, estudiamos el papel de Chk1, Srk1 y Par1. Observamos que tanto Chk1 como Srk1 afectan parcialmente la parada de ciclo inducida por las proteínas *b*. Aún queda por determinar si los efectos parciales son aditivos y por lo tanto ambas quinasas formarían parte de la misma regulación.

De esta manera, quinasas que han sido involucradas en otras rutas que llevan a una parada transitoria del ciclo celular en respuesta a distintas situaciones de estrés, podrían estar implicadas en la parada de ciclo inducida por las proteínas b. Así, una misma ruta estaría integrando señales distintas según el estado de desarrollo. El hecho de que Par1 no afectara el ciclo celular puede deberse a que esta quinasa esté implicada en la progresión normal del ciclo celular como C-TAK1 (Peng *et al.*, 1998), o a que como las proteínas de esta familia de *S. pombe* y *S. cerevisiae* no esté implicada en la regulación del ciclo celular (Levin *et al.*, 1987; Levin y Bishop, 1990).

La caracterización descrita hasta el momento no explicaba totalmente la parada de ciclo observada, sugiriendo un mecanismo robusto que debería implicar varios reguladores de ciclo. Por ello, estudiamos otros posibles reguladores del paso G2/M analizando su papel en la parada del ciclo celular que ocurre en el filamento infectivo.

La proteína Hsl1 es regulada negativamente durante la inducción del sistema feromona-receptor (regulada por el *locus a*) y la inducción de la formación del filamento infectivo (regulada por el *locus b*). Los análisis hechos cuando se induce el filamento infectivo sin parada de ciclo celular y en situaciones donde se observa crecimiento polar sin parada de ciclo celular, sugieren que la caída de los niveles de *hsl1* está asociada a los *loci a* y *b*. Sin embargo, la regulación de *hsl1* no determina la parada del ciclo celular observada en el filamento infectivo.

Por otro lado, Plk1 podría ser otra proteína implicada en la regulación de la parada del ciclo celular observada cuando se induce la formación del filamento infectivo. A diferencia de Hsl1, Plk1 parece estar regulada específicamente por la activación de los genes del *locus b*. Esta regulación está asociada a la parada del ciclo celular. Creemos que el papel de Plk1 podría estar relacionado con la duración relativa de las paradas del ciclo celular. Suponiendo que la parada inducida por feromona sea una parada de corta duración, que permita al encuentro con el compañero compatible y que la parada inducida por las proteínas b implique tiempos más largos en los que se establece el dicarionte, se explora la superficie vegetal y luego se penetra el tejido, Plk1 podría estar

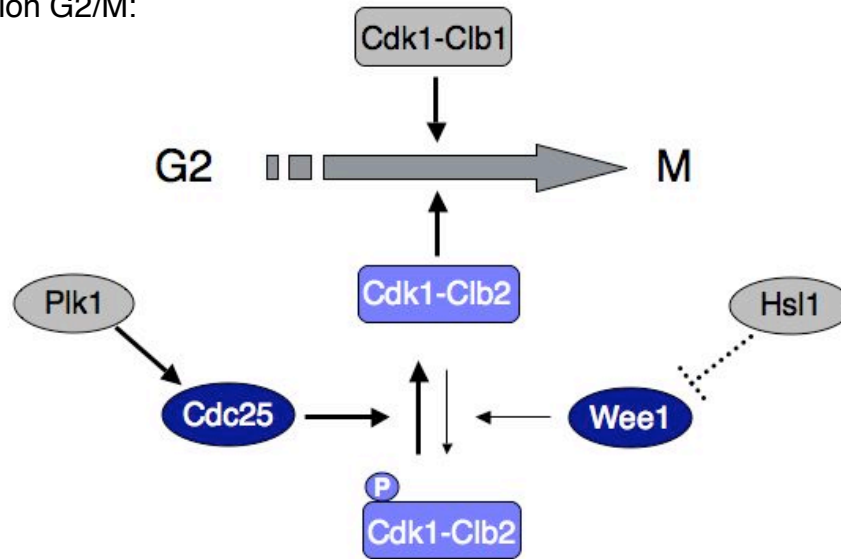
regulando el mantenimiento y por lo tanto la duración de la parada de ciclo. De acuerdo con esta suposición, hemos observado que la expresión de *plk1* es regulada negativamente sobre la planta. Una vez dentro del tejido vegetal, la expresión de *plk1* vuelve a activarse.

Por otra parte, el hecho de que la expresión heteróloga de *plk1* no active el ciclo celular puede deberse a que sus sustratos podrían estar regulados negativamente por el programa de las proteínas *b*. Se puede imaginar una situación en la cual proteínas como Cdc25 o Clb1 podrían ser sus sustratos, pero cuando se inducen las proteínas *b* y se para el ciclo celular, Cdc25 está en el citoplasma enmascarada por Bmh1 y Clb1 es regulada negativamente. Por lo tanto, la regulación negativa de *clb1* asociada a la parada del ciclo celular, también puede implicarse en el mantenimiento de la parada.

Modelo de la parada del ciclo celular

Con los datos presentados en este estudio, se propone un modelo de trabajo (Fig. 79) donde un grupo de proteínas estaría encargado de establecer la parada de ciclo, y otro grupo estaría encargado de mantenerla. En este escenario, proteínas que responden a estrés generando una parada transitoria, como Chk1 y Srk1 podrían percibir la primer señal para parar el ciclo celular una vez que se activan los genes del *locus b*. Este primer establecimiento, podría dar lugar a que se controlen otras condiciones para continuar con el proceso infectivo. Señales internas y señales de la planta, que podrían indicar el éxito del proceso infectivo. A continuación, la regulación negativa de otros reguladores podrían mantener la parada de ciclo. En este grupo de proteínas incluimos a Clb1, Hsl1, Plk1 que, como se ha comentado en esta discusión, participarían de distinta manera e integrando distintas señales durante este proceso.

Regulación G2/M:



Regulación G2/M cuando se inducen las proteínas b:

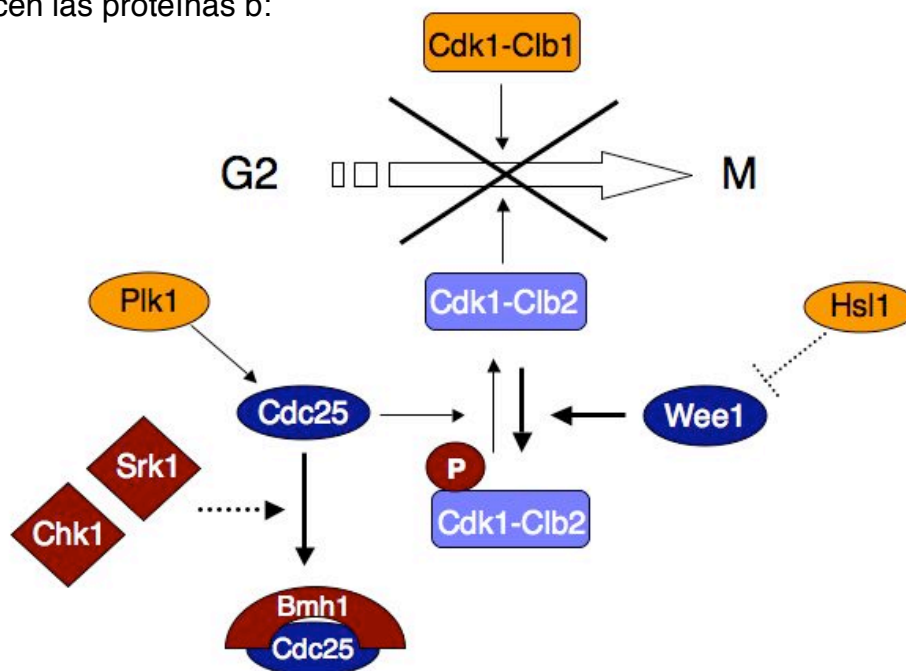


Figura 79. La transición G2/M está regulada por los complejos Cdk1/Clb1 y Cdk1/Clb2. La actividad de este complejo es modulada por fosforilación inhibitoria. Hsl1 y Plk1 son posibles reguladores promitóticos. Cuando se inducen las proteínas b, el ciclo celular se detiene en G2. La fosforilación del complejo Cdk1/Clb2 es fundamental en la parada de ciclo. Bmh1 podría retener a Cdc25 en el citoplasma, mientras que la caída de los niveles de *plk1* y *clb1* podría mantener la parada de ciclo. En rojo se marcan las regulaciones a nivel de proteína y en naranja se indica la regulación transcripcional negativa de *clb1*, *plk1* y *hsl1* cuando se inducen las proteínas b. Las líneas punteadas indican posibles regulaciones y el grosor de las líneas es representativo de la dirección de los procesos.

Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La parada del ciclo celular en el filamento infectivo ocurre en la fase G2 y depende del factor de transcripción b.
2. El mecanismo por el cual se produce la parada de ciclo es un mecanismo robusto que implica la participación de varios reguladores de ciclo celular.
3. La fosforilación inhibitoria es determinante en la parada del ciclo celular en el filamento infectivo.
4. La regulación de la ciclina Clb1 podría estar implicada en el mantenimiento de dicha parada del ciclo celular.
5. La proteína Bmh1 es un regulador negativo de Cdc25 necesario para la formación del filamento infectivo y la parada del ciclo celular. La interacción entre las proteínas Bmh1 y Cdc25 está implicada en la regulación de la parada de ciclo cuando se induce el factor de transcripción b y en el control de daño a ADN.
6. Las quinasas Chk1 y Srk1 tienen un efecto parcial sobre la parada de ciclo inducida durante la formación del filamento infectivo. La quinasa Chk1 está implicada en el control de daño a ADN.
7. La proteína Plk1 tendría un papel específico en la parada del ciclo celular inducida por las proteínas b que podría estar relacionado con el mantenimiento de la parada de ciclo. En un ciclo celular normal es fundamental en la transición G2/M y para la actividad de Cdc25.
8. La quinasa Hsl1 tendría funciones vinculadas con la regulación de la duración de la fase G2 y la adaptación al medio.

Bibliografía

- Abrieu, A., Brassac, T., Galas, S., Fisher, D., Labbé, J. and Dorée, M. (1998). The Polo-like kinase Plx1 is a component of the MPF amplification loop at the G₂/M-phase transition of the cell cycle in *Xenopus* eggs. *J. Cell Sci.* 111: 1751-1757.
- Agrios, G. N. (1988). *Plant Pathology*. London: Academic Press.
- Al- Khodairy, F., Fotou, F. E. Sheldrick, K. S., Griffiths, D. J. F., Lehmann, A. R. and Carr, A. M. (1994). Identification and characterization of new elements involved in checkpoints and feedback controls in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 5: 147-160.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLead, M. and Warbrick, E. (1993). *Experiments with Fission Yeast: A laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Asano, S., Park, J-E., Sakchaisri, K., Yu, L-R., Song, S., Suavilai, P., Veenstra, T. D. and Lee, K. S. (2005). Concerted mechanisms of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. *EMBO J.* 24: 2194-2204.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1997). *Current Protocols in Molecular Biology*. Ed. Wiley, New York.
- Banuett, F. (1995). Genetics of *Ustilago maydis*, a fungal pathogen that induce tumors in maize. *Annu. Rev. Genet.* 29: 179-208..
- Banuett, F. and Herskowitz, (1989). Different alleles are necessary for maintenance of filamentous growth but not for meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 5878-5882.
- Banuett, F. and Herskowitz, I. (1996). Discrete developmental stages during teliospore formation in the corn smut fungus, *Ustilago maydis*. *Development* 122: 2965-2976.
- Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S. and Zinder, M. (1999). Nim1-related Kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev.* 13:176-187.
- Bartholomew, C. R., Woo, S. H., Chung, Y. S., Jones, C. and Hardy, C. F. J. (2001). Cdc5 Interacts with the Wee1 Kinase in Budding Yeast. *Mol. Cell Biol.* 21:4949-4959.

- Becht, P., Köing, J. and Feldbrügge, M. (2006). The RNA-binding protein Rrm4 is essential for polarity in *Ustilago maydis* and shuttles along microtubules. J. Cell Sci. 119: 4964-4973.
- Belenguer, P., Pelloquin, L., Oustrin, M-L. and Ducommun, B. (1997). Role of the fission yeast nim1 protein kinase in the cell cycle response to nutritional signals. Bioch. Bioph. Res. Com. 232: 204-208.
- Bohlmann, R., Schauwecker, F., Basse, C. and Kahmann, R. (1994). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions. Vol. 3 Daniels, M. J. (ed).
- Bölker, M. (2001). *Ustilago maydis*: a valuable model for the study of fungal dimorphism and virulence. Microbiology 147: 1395-1401.
- Bölker, M., Genin, S., Lehmler, C. and Kahmann, R. (1995). Genetic regulation of mating and dimorphism in *Ustilago maydis*. Can. J. Bot. 73: S320-S325.
- Bottin, A., Kämper, J. and Kahmann, R. (1996). Isolation of a carbon source regulated gene from *Ustilago maydis*. Mol. Gen. Genet. 25, 342-352.
- Brachmann, A., König, J., Julius, C. and Feldbrügge, M. (2004). A reverse genetic approach for generating gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics 272: 216-226.
- Brachmann, A., Weinzierl, G., Kämper, J. and Kahmann, R. (2001). Identification of genes in the bW/bE regulatory cascade in *Ustilago maydis*. Mol. Microbiol. 42, 1047-1063.
- Casselton, L. and Olesnicky, N. (1998). Molecular genetics of mating recognition in basidiomycete fungi. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 55-70.
- Castillo-Lluva, S., and Pérez-Martín, J. (2005). The induction of the mating program in the phytopathogen *Ustilago maydis* is controlled by a G1 cyclin. Plant Cell 17: 3544- 3560.
- Castillo-Lluva, S., García-Muse, T. and Pérez-Martín, J. (2004). A member of the Fizzy-related family of APC activators is required at different stages of plant infection by *Ustilago maydis*. J. Cell. Sci. 117: 4143-4156.

- Cheng, L., Hunke, L. and Hardy, C. F. J. (1998). Cell Cycle Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Polo-Like Kinase Cdc5p. *Mol. Cell. Biol.* 18: 7360-7370.
- Cid, V. J., Shulewitz, M. J., McDonald, K. L. and Thorner, J. (2001). Dynamic Localization of the Swe1 Regulator Hsl7 During the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Cycle. *Mol. Biol. Cell.* 12: 1645-1669.
- Coleman, T. R. and Dunphy, W. G. (1994). Cdc2 regulatory factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 877-882.
- Darling, D., Yingling, J. and Wynshaw-Boris, A. (2005). Role of 14-3-3 proteins in eukaryotic signaling and development. *Current Topics in Developmental Biology* 68: 281- 315.
- Den Haese, G. J., Waleorth, N., Carr. A. M. and Gould, K. (1995). The Wee1 protein kinase regulates T14 phosphorylation in fission yeast Cdc2. *Mol. Biol. Cell* 6: 371-385.
- Donaldson, M. M., Tavares, A. A., M., Hagan, I. M., Nigg, E. A. and Glover, D. M. (2001). The mitotic roles of Polo-like Kinase. *J. Cell Sci.* 114: 2357-2358.
- Donzelli, M. and Draetta, G. F. (2003). Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO J.* 4: 671-677.
- Elia, A. E. H., Rellos, P., Haire, L. F., Chao, J. W., Ivins, F. J., Hoepker, K., Mohammad, D., Cantley, L. C., Smerdon, S. J. and Yaffe, M. B. (2003b). The Molecular Basis for Phosphodependent Substrate Targeting and Regulation of Plks by the Polo-Box Domain. *Cell* 115: 83-95.
- Elia, A. E., Cantley, L. C. and Yaffe, M. B. (2003a). Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* 299: 1228-1231.
- Feldbrügge, M., Kämper, J., Steinberg, G. and Kahmann, R. (2004). Regulation of mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 666-672.
- Flor-Parra, I. Caracterización de factores específicos del programa de virulencia *Ustilago maydis*. Tesis Doctoral por la Universidad Autónoma de Madrid.

- Furnari, B., Blasina, A., Boddy, M. N., McGowan, C. H. and Russell, P. (1999). Cdc25 inhibited *in vivo* and *in vitro* by checkpoint kinases Cds1 y Chk1. Mol. Biol. Cell 10: 833-845.
- García-Muse, T., Steinberg, G. and Pérez-Martín, J. (2003). Pheromone-induced G2 arrest in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. Eukaryotic Cell 2: 494-500.
- García-Muse, T., Steinberg, G. and Pérez-Martín, J. (2004). Characterization of Btype cyclins in the smut fungus *Ustilago maydis*: roles in morphogenesis and pathogenicity. J. Cell Sci. 117: 487-506.
- Garrido, E. and Pérez-Martín, J. (2003) The *crk1* gene encodes an Ime2-related protein that is required for morphogenesis in the plant pathogen *Ustilago maydis*. Mol. Microbiol. 47: 729-743.
- Garrido, E., Voss, U., Muller, P., Castillo-Lluva, S., Kahmann, R. and Pérez-Martín, J. (2004) The induction of sexual development and virulence in the smut fungus *Ustilago maydis* depends on Crk1, a novel MAPK protein. Genes Dev. 18: 3117-3130.
- Gillisen, B., Bergemann, J., Sandmann, C., Schroeer, B., Bölker, M. and Kahmann, R. (1992). A two -component regulatory system for self/non self recognition in *Ustilago maydis*. Cell. 68: 647-657.
- Gould, K., L. and Nurse, P. (1989). Tyrosine phosphorylation of the fission yeast *cdc2⁺* protein kinase regulates entry into mitosis. Nature 342:39-45.
- Gow, N. A. R., Brown, A. J. P. and Odds F. C. (2002). Fungal morphogenesis and host invasión. Curr. Opin. Microbiol. 5, 366-371.
- Graves, P.R., Lovly, C. M., Uy, G. L., Piwinica-Worms, H. (2001). Localization of human Cdc25C is regulated both by nuclear export and 14-3-3 protein binding. Oncogene 20: 1839-1851.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hanrahan, J. and Snyder, M. (2003). Cytoskeletal activation of checkpoint kinase. Mol. Cell 12: 663-673.
- Hartmann, H. A., Kahmann, R. and Bölker, M. (1996). The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenecity in

- Ustilago maydis*. EMBO J. 15:1632-1641.
- Hermeking, H., Benzinger, A. 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. (2006). Seminars in Cancer Biology 16: 183-192.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. (1987) A ten-minutes DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene, 57, 267-272.
- Holliday, R. (1974). In Handbook of Genetics, (ed. R. C. King), Plenum Press, New York, USA .
- Jacobs, C. W., Mattiichack, S. J. and Knowles, J. F. (1994). Budding patterns during the cell cycle of the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. Can. J. Bot. 72: 1675-1680.
- Jang, Y.-J., Lin, C.-Y., Ma, S. and Erikson, R., L. (2002). Functional studies on the role of the C-terminal domain of mammalian polo-like Kinase. Proc. Natl. Acad. Sci USA 99: 1984-1989.
- Kaffarnik, F., Müller, P., Leibudgut, M., Kahmann, R. and Feldbrugge, M. (2003) PKA and MAPK phosphorylation of Prf1 allows promoter discrimination in *Ustilago maydis*. EMBO J. 22, 5817-5826.
- Kahmann, R., and Kämper, J. (2004). *Ustilago maydis*: how its biology relates to pathogenic development. New Phytol. 164, 31-42.
- Kaiser, C., Michaelis, S. and Mitchell, A. (1994). Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Kämper, J. (2004). A PCR-based system for highly efficient generation of gene replacement mutants in *Ustilago maydis*. Mol. Genet. Genomics 271, 103-110.
- Kämper, J., Reichmann, M., Romeris, T., Bölker, M. and Kahmann, R. (1995). Multiallelic recognition: nonself-dependent dimerization of the bE y bW homeodomain proteins in *Ustilago maydis*. 81: 73-83.
- Kanoh, J. and Russel, P. (1998). The protein Kinase Cdr2, Related to Nim1/Cdr1 Mitotic Inducer, Regulates the Onset of Mitosis in Fission Yeast. Mol. Biol. Cell. 9:3321-3334.
- Karlsson-Rosenthal, C. and Millar, J. B. A. (2006). Cdc25: mechanisms of checkpoint inhibition and recovery. Trends Cell Biol. 16: 285-292.

- Klosterman, S. J., Perlin, M. H., Garcia-Pedrajas, M., Covert, S. F. and Gold, S. E. Genetics of Morphogenesis and Pathogenic Development of *Ustilago maydis*. *Advances Gen.* 57: 1-47.
- Kronstad, J.W. and Leong, S.A. (1989) Isolation of two alleles of the b locus of *Ustilago maydis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 978-982.
- Krüger, J., Loubradou, G., Regenfelder, E., Hartmann, A. and Kahmann, R. Crosstalk between cAMP and pheromone signalling pathways in *Ustilago maydis*. *Mol. Gen. Genet.* 260: 193-198.
- Kumagai, A. and Dunphy, W. G. (1999). 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer Cdc25. *Genes Dev.* 13: 1067-1072.
- Kumagai, A., Yakowec, P. S., Dunphy, W. G. (1998). 14-3-3 proteins act as negative regulators of the mitotic inducer Cdc25 in *Xenopus* egg extracts. *Mol Biol Cell* 9: 345-354.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-687.
- Lee, K. L. and Erikson, R. (1997). Plk is a functional homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc5, and elevated Plk activity induces multiple septation structures. *Mol. Cell. Biol.* 17: 3408-3417.
- Lee, K. S., Park, J., Asano, S. and Park, C. J. (2005). Yeast polo-like kinases: functionally conserved multitask mitotic regulators. *Oncogene* 24:217-229.
- Levin, D. E. and Bishop, M. (1990). A putative protein kinase gene (*kin1+*) is important for growth polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 8272-8276.
- Levin, D. E., Hammond, C. I. Ralston, R. O. and Bishop, J. M. (1987). Two yeast genes that encode unusual protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 6035-6039..
- Lew, D. J. (2003). The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:648-653.
- Liu, J., Lewellyn, A. L., Chen, L. G. and Mallers, J. L. (2004). The Polo Box Is Required for Multiple Function of Plx1 in Mitosis. *J. Biol. Chem.* 279: 21367-21373.

- López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A-L., Alemany, V., Sanchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J. B. A. and Aligue, R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress-activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol. Cell* 17: 49-59.
- Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O. and Russell P. (1999). Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature* 397: 172-175.
- Lottersberger, F., Panza, A., Lucchini, G., Piatti, S. and Longhese, M. P. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins are required for the G1/S transition, actin cytoskeleton organization and cell wall integrity. *Genetics* 173: 661-675.
- Lowery, D. M., Mohammad, D. H., Elia, A. E. H. and Yaffe, M. B. (2004). The Polo-Box Domain. *Cell Cycle* 3: 128-131.
- Lundgren, K., Walworth, N., Booher, R., Dembski, M., Kirschner and Beach, D. (1991). mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell* 64: 1111-1122.
- Mahlert, M., Leveleki, L., Hlubek, A., Sandrock, B. and Bölker, M. (2006). Rac1 and Cdc42 regulate hyphal growth and cytokinesis in the dimorphic fungus *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 59: 567-578.
- Manke, I. A., Nguyen, A., Lim, D., Stewart, M. Q., Elia A. E. H. and Yaffe, M., B. (2005). MAPKAP Kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol. Cell.* 17: 37-48.
- Martínez-Espinoza, A. D., García-Pedrajas, M. D. and Gold S. E. (2002) The Ustilaginales as plant pests and model systems. *Fungal Genetics and Biology*, 35, 1-20.
- McGowan, C. H. (2002). Checking in on Cds1 (Chk2): a checkpoint kinase and tumor suppressor. *BioEssays* 24: 502-511.
- McMillan, J. N., Theesfeld, C. L., Harrison, J. C., Bardes, E. S. G. and Lew, D. J. (2002). Determinants of Swe1p Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 13:3560-3575.

- Millar, J., McGowan, C., Jones, R., Sadhu, K., Bueno, A., Richardson, H. and Russell, P. (1991). Cdc25 M-phase inducer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 56: 577-584.
- Morgan, D., O. (1995). Principles of CDK regulation. Nature 374:131-133.
- Morgan, D.O. (1997). Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microporocessors. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 13, 261-291.
- Müller, P., Aichinger, C., Feldbrugge, M. and Kahmann, R. (1999) The MAP kinase Kpp2 regulates mating and pathogenic development in *Ustilago maydis*. Mol Microbiol, 34, 1007-1017.
- Müller, P., Weinzierl, G., Brachmann, A., Feldbrügge, M., and Kahmann, R. (2003). Mating and pathogenic development of the smut *fungus Ustilago maydis* are regulated by one mitogen-activated protein kinase cascade. Eukaryotic Cell 2, 1187-1199.
- Mulvihill, D. P. and Hyams, J. S. (2002). Cytokinetic actomyosin ring formation and septation in fission yeast are dependent on the full recruitment of the polo-like kinase Plo1 to the spindle pole body and a functional spindle assembly checkpoint. J. Cell Sci. 115: 3575-3586.
- Nasmyth, K. (1993). Control of yeast cell cycle by the CDC28 protein kinase. Curr Biol. 5: 166-179.
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinase: key regulators of the eukaryotic cell cycle. BioEssays 17: 471-480.
- Nigg, E. A. (1998). Polo-like Kinases: Positive regulators of cell division from start to finish. Curr. Opin. Cell Biol. 10: 776-783.
- O'Neill, T., Giarratani, L., Cheng, P., Iyer, L., Lee, C-H., Bobiak, M., Kanai, F., Zhou, B-B., Chung, J. H. and Rathbun, G. A. (2002). Determination of substrate motifs for human Chk1 y Cds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. J. Biol. Chem. 277: 16102- 16115.
- Ohkura, H., Hagan, I. M. and Glover, D. M. (1995). The conserved *Schizosaccharomyces pombe* kinase plo1, required to form a bipolar spindle, the actin ring, and septum, can drive septum formation in G1 and G2 cells. Genes Dev. 9: 1059-1073.

- Park, C. J., Song, S., Lee, P. R., Shou, W., Deshaies, R. J. and Lee, K. S. (2003). Loss of *CDC5* function in *Saccharomyces cerevisiae* Leads to Defects in Swe1p Regulation and Bfa1p/Bub2p-Independent Cytokinesis. *Genetics* 163: 21-33.
- Park, J., Park, C., Sakchaisri, K., Karpova, T., Asano, S., McNally, J., Sunwoo, Y., Leem, S. and Lee, K. S. (2004). Novel Functional Dissection of the Localization-Specific Roles of Budding Yeast Polo Kinase Cdc5p. *Mol. Cell. Biol.* 24:9873-9886.
- Parker, L. L., Watlter, S. A. Young, P. G. and Piwnica-Worms. (1993). Phosphorylation and inactivation of the mitotic inhibitor Wee1 by the *nim1/cdr1* kinase. *Nature* 363: 736-741.
- Peng, C-Y., Graves, P. R., Ogg, S., Thoma, R S., Byrnes III, M. J., Wu, Z., Stephenson, M. T. and Piwnica-Worms, H. (1998). C-TAK1 protein kinase phosphorylates human Cdc25C on Serine 216 and promotes 14-3-3 protein binding. *Cell Growth Differ.* 9: 197-208.
- Peng, C-Y., Graves, S., Thoma, R S., Wu, Z., Shaw, A. S. and Piwnica-Worms, H. (1997). Mitotic and G2 checkpoint control: replication of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine -216. *Science.* 277: 1501-1505.
- Pérez-Martín, J., Castillo-Lluva, S., Sgarlata, C., Flor-Parra, I., Mielnichuk, N., Torreblanca, J. and Carbó, N. (2006). Pathocycles: *Ustilago maydis* as a model to study the relationships between cell cycle and virulence in pathogenic fungi. *Mol. Genet. Genomics* 276: 211-229.
- Perry, J. A. and Kornbluth, S. (2007). Cdc25 and Wee1: analogous opposites? *Cell Division* 2: 1-12.
- Pines, J. and Hunter, T. (1991). Human cyclins A and B1 are differentially located in the cell and undergo cell-cycle dependent nuclear transport. *J. Cell Biol.* 115: 1-17.
- Qian, Y., Erikson, E., Taieb, F. E. and Maller, J. L. (2001). The Polo-like kinase Plx1 Is Required for Activation of the Phosphatase Cdc25C and Cyclin B-Cdc2 in *Xenopus* Oocytes. *Mol. Biol. Cell* 12: 1791-1799.
- Romeis, T., Brachmann, A., Kahmann, R., and Kamper, J. (2000). Identification

- of a target gene for the bE-bW homeodomain protein complex in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 37, 54–66.
- Russell, P. and Nurse P. (1986). *cdc25+* functions as a inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*, 45: 145-153.
- Sakchaisri, K., Ascano, S., Yu, L., Shulewitz, M., J., Park, C., J., Park, J., Cho, Y., Veenstra, T., D., Thorner, J. and Lee, K., S. (2004). Coupling morphogenesis to mitotic entry. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 101:4124-4129.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press.
- Sanchez, Y., Wong, C., Thoma, R. S., Richman, R., Wu, Z., Piwnicka-Worms, H. and Elledge, S. J. (1997). Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25. *Science*. 277: 1497-1501.
- Sánchez-Martínez C. and Pérez-Martín, J. (2001). Dimorphism in fungal pathogens: *Candida albicans* and *Ustilago maydis*, similar inputs, different outputs. *Curr. Opin. Microbiol.* 4, 214-221.
- Scherer, M., Heimel, K., Starke, V. and Kämper, J. (2006). The Clp1 protein is required for clamp formation and pathogenic development of *Ustilago maydis*. *Plant Cell* 18: 2388-2401.
- Schmitt, M. E., Brown, T. A. and Trumpower, B. L. (1990). A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acid. Res.* 18: 3091-3092.
- Schulz, B., Banuett, F., Dahl, M., Schlesinger, R., Schäfer, W., Martin, T., Herskowitz, I. and Kahmann, R. (1990). The b alleles of *U. maydis*, whose combinations program pathogenic development, code for polypeptides containing a homeodomain-related motif. *Cell* 60: 295-306.
- Sgarlata, C. and Pérez-Martín, J. (2005a). Inhibitory phosphorylation of a mitotic cyclin-dependent kinase regulates the morphogenesis, cell size and virulence of the smut fungus *Ustilago maydis*. *J. Cell. Sci.* 15: 3607-3622.
- Sgarlata, C. and Pérez-Martín, J. (2005b). The Cdc25 phosphatase is essential for the G2/M phase transition in the basidiomycete *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* 58: 1482-1496.

- Sgarlata, C. Estudio de los reguladores de la transición G₂/M del ciclo celular de *U. maydis* y su participación en el proceso de patogénesis. (2005). Tesis Doctoral por la Uiversidad Autónoma de Madrid.
- Sherr, C. J. (1993). Mammalian G₁ cyclins. *Cell* 73- 1059- 1065.
- Sherr, C. J. and Roberts, J. M. (1995). Inhibitors of mammalian G₁ cyclin-dependent kinase. *Genes Dev.* 9: 1149-1163.
- Shulewitz, M., J., Inouye, C., J. and Thorner, J. (1999). Hsl7 Localizes to a Septin Ring and Serves as an Adapter in a Regulatory Pathway That relieves Tyrosine Phosphorylation of Cdc28 Protein Kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19:7123-7137.
- Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bähler, J., Jones, N., Morgan, B. A. and Quinn, J. (2002). The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 277- 33411-33421.
- Smits, V. A. J. and Medema, R., H. (2001). Checking out the G₂/M transition. *Biochem. Bioph. Act* 1519: 1-12.
- Smits, V. A., Klompmaker, R., Arnaud, L., Rijksen, G., Nigg, E. A. and Medema, R. H. (2000). Polo like kinase-1 is a target of the DNA damage checkpoint. *Nat. Cell. Biol.* 2: 672-676.
- Snetselaar, K. M., and Mims, C. W. (1992). Sporidial fusion and infection of maize seedlings by the smut fungus *Ustilago maydis*. *Mycologia*, 84, 193-203.
- Snetselaar, K. M., and Mims, C. W. (1993). Infection of maize stigmas by *Ustilago maydis*: light and electron microscopy. *Phytopathology* 83, 843-850.
- Snetselaar, K. M., Bölker, M., and Kahmann, R. (1996). *Ustilago maydis* mating hyphae orient their growth toward pheromone sources. *Fungal Genet. Biol.* 20, 299-312.
- Spellig, T., Bölker, M., lottspeich, F., Frank, R. W., and Kahmann, R. (1994). Pheromones trigger filamentous growth in *Ustilago maydis*. *EMBO J.* 13,1620-1627.
- Spellig, T., Bottin A. and Kahmann, R. (1996). Green fluorescent protein (GFP) as a new vital marker in the phytopathogenic fungus *Ustilago maydis*. *Mol*

Gen Genet 252: 503-509.

Steinberg, G., Wedlich-Söldner, R., Brill, M., and Schulz, I. (2001). Microtubules in the fungal pathogen *Ustilago maydis* are highly dynamic and determine cell polarity. J. Cell Sci. 114, 609-622.

Straube, A., Hause, G. Fink, G. and Steinberg, G. (2005) Conventional kinesin mediates microtubule-microtubule interactions in vivo. Mol Biol Cell.17, 907-16.

Tanaka, K., Petersen, J., MacIver, F., Mulvihill, D. P., Glover, D. M. and Hagan, I. M. (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO J. 20: 1259-1270.

Toyoshima-Morimoto, F., Taniguchi, E. and Nishida, E. (2002). Plk1 promotes nuclear translocation of human Cdc25C during prophase. EMBO 3: 341-348.

Usui, T. and Petrini, H. J. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* 14-3-3 proteins Bmh1 y Bmh2 directly influences the DNA damage-dependent functions of Rad53. . Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 104: 2797-2802.

Van de Weerd, B. C. M. and Medema, R. H. (2006). Polo-Like Kinases: a team in control of cell division. Cell Cycle 5: 853-864.

van Exuden, G. P. H., Steensma H. Y de (2006). Yeast 14-3-3 proteins. Yeast. 23: 159-171.

van Vugt, M. A. T. M. and Medema, R. H. (2004). Checkpoint Adaptation and Recovery. Cell Cycle 3: 1383-1386.

van Vugt, M. A. T. M. and Medema, R. H. (2005). Getting in and out of mitosis with Polo-like kinase-1. Oncogene 24: 2844-2859.

van Vugt, M. A. T. M., Brás A. and Medema, R. H. (2004). Polo-like Kinase-1 Controls Recovery from a G2 DNA Damage-Induced Arrest in Mammalian Cells. Mol. Cell 15: 799-811.

Walworth, N. S., Davey, S. and Beach, D., (1992). Fission yeast Chk1 protein kinase links the rad checkpoint to cdc2. Nature 363: 368-371.

Watanabe, N., Arai, H., Nishihara, Y., Taniguchi, M., Watanabe, N., Hunter, T. and Osada H. (2004). M-phase kinases induce phospho-dependent

- ubiquitination of somatic Wee1 by SCF ^{β -TrCP}. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 13: 4419-4424.
- Wu, L., Shiozaki, K., Aligue, R. and Russell, P. (1996). Spatial Organization of the Nim1-Wee1-Cdc2 Mitotic Control Network in *Schizosaccharomyces pombe*. Mol. Biol. Cell. 7:1749-1758.
- Zeng, Y., Forbes, K. C., Wu, Z., Moreno, S., Piwnica-Worms, H. and Enoch, T. (1998). Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. Nature 395: 507-510.

Anexo



ANEXO 1

A continuación se detallan los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Tabla 4. Secuencias de los oligonucleótidos usados durante este estudio.

Los nucleótidos mutados están resaltados y los sitios de restricción generados están subrayados. Las coordenadas se indican considerando +1 la adenina del ATG del gen correspondiente. Los nucleótidos cbx1-2 anillan en el gen de resistencia a la carboxina, los smut1-2 en el de resistencia a la higromicina, el oligonucleótido tag1 en los epítomos myc y HA, el oligonucleótido gfp1 en la proteína GFP, el rfp2 en la proteína RFP y los oligonucleótidos crg1, nar1 y tef1 en los promotores *Pcrg1*, *Pnar1* y *Ptef1* respectivamente.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Coordenadas
cbx1	TCTGGGTTTCGCGCGAGATCTCACAGAGCA	
cbx2	AATTGCACAGATCAAGAAGGACATGGCCGT	
gfp1	ACGCTGAACTTGTGGCCGTTTACGTCG	
crg1	GAGATCACGACACCGCGAGGTTTGCGGTGA	
nar1	GGTGAATAGTGAGAACAGTCTTCGATCACTCTG	
rfp2	GAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCG	
tef1	GGCGCAAGAAAATTTTCTCTGGTTCTG	
smut1	CGATGGCTGTGTAGAAGTACTCGCCGATAG	
smut3	ATTCACGTTTTGTAGCACGACTCACATC	
tag1	CCAAATGTTTGAACGATCTGCAGC	
1433-1	GGGGTACCGTGTGCGGTGTAGCCGCGCGATC	-1096
1433-4	GGGGTACCGCGGACTGTGCTGTGCAGCCCC	+2110
1433-7	<u>CATATG</u> CCCCGAATCGCGTGAAGACTCTGTC	+1
1433-8	<u>GGTACC</u> CCTCGATCTTCTCACGGTAGG	+507
1433-9	<u>GAATTC</u> TTGCTACTGGATCTGCGACAAAGC	-200
1433-10	<u>GGTACC</u> CTCATTGTTATCGCTTCACTCTCC	-929
1433-11	<u>GGTACC</u> AGCGACTAGCGTCAAACGAACAGC	+1994
1433-13	<u>TTAATTA</u> AGTAGCAGCGACAAAAACCTGAC	+66
1433-14	<u>TCTGGCCGCGTTGGCC</u> GCGGCCTCCTCACCCCTTGGCCTCGGCAG	+1028
1433-15	ATAG <u>GCCTGAGTGGCC</u> GACCTCTCCTTCTTGCTCCCCTCCCC	+1033
1433-16	<u>TTAATTA</u> CACTCACGACTCACGACTGCAC	+2052
1433-17	<u>GAATTC</u> GGCGGCCTCCTCACCCCTTGGCC	+1017
cdc25-24	AATTCCATATGGCTACTCTCCTCTCCT	+1

cdc25-27	CTGG <u>CC</u> CACGCCATGGCTTCGCGCCACTTTGGC	+624
cdc25-28	GCCAAAGTGGCGCGAAGCCATGGCGTGGGCCAG	+656
cdc25-29	GTGCCCAGGGCAGCTGCAGCCTCCAGCTCAAGC	+1362
cdc25-30	GCTTGAGCTGGAGGCTGCAGCTGCCCTGGGCAC	+1394
cdc25-31	CCTGCGATGCGAGCCCGGGCGCGCCCCATTATTTACGC	+1731
cdc25-32	GCGTAAATAATGGGGGCGCGCGCCCGGCTCGCATCGCAGG	+1769
cdc25-33	ACTAGTCATGAGTCGTGAGTGTGTGTG	-3176
cdc25-34	AGGCCTTCGCCACGCCATACCCACTCGCTC	+321
cdc25-35	GGAATTCGGAAGGCCTGGCGAGGTATTGGTGGTGG	+336
cdc25-36	GGAATTCCTCGCTGCCCTCCTCAATCGCTCC	+3187
cdc25gfp1	CTGAGAGCCTTCCCGGCTTTGGTGCTTCTG	+1932
cdc25gfp2	TTAATTAACAACGTCAAGGATGACGGACTC	+1974
cdc25gfp3	GGTGGCCGCGTTGGCCGACATATGTCGCGACAAGATGTT	+2969
cdc25gfp4	ATAGGCCTGAGTGGCCAGCAGCATGTGCGAGCCGACGAC	+3007
cdc25gfp5	TTAATTAACTGGAACGGGTATGCTCTGCGC	+4009
chk1-1	ATCCATCCGTGATTGTAGACTTTGCAACAC	-1166
chk1-2	TTAATTAAATGCTGGTGATGACATCAGAGAGGGA	-1054
chk1-3	GGTGGCCATCTAGGCCACTGCGTCTAGAGGTGTTGGTGG	-47
chk1-7	ATAGGCCTGAGTGGCCACACGCTTTTTCTCATCACCGC	+1990
chk1-8	TTAATTAAATTGACCCTTGAGTGTACCGATGAA	+3157
chk1-9d	CAACTTGCCGAGGAAGAGTTGCCAAGGATC	+3229
clb1Bamh1	GGATCCCTAGAAGGTCTCCGTCGCTTC	+2034
clb2-3	CGGGATCCGCCGGTCAGCTCTCGGCTGAG	+901
clb2-5	TCCTCAAAGCCTTGGTCCAGCAAACGC	+1676
hsl1-5	CAATTGGATGATAGCCGAGCCAAGGTC	+3816
hsl1-6	TAGGCCTGAGTGGCCTTAGCTTGTCTGTTTCTTTC	+3852
hsl1-7	GTGGAGGTGAACCCCTTCGACTTTCTT	+4819
hsl1-8	GTCATCATGTGATTCACGACTCGCTCG	+4930
hsl1-10	GGTACCCTTGGACGCCGAAACAAATGC	+1853
hsl1-14	CATATGTCTTCCTCGCAACGCCCGTG	+1
hsl1-15	AGGCCATCTAGGCCACAGGTGTAGAATGTC	-19
hsl1-16	CGCCTTCTAGTCCTCTCTACCTCCGCT	-810
hsl1-17	CAATACCGAGGAGCAGCTCAAGACTCG	-1040
hsl1-18	GACAATCTTTTTGGTTTCATCGAGGAG	+896
hsl1-19	GGTACCTCCGCTGACGATCTCGGGACT	+998
hsl1-20	GAAATTCGGGTAGAGTGATGCTGTCAAAAC	-190
hsl1-21	GGTACCTCGAGCTCGAGCGCCAGAGTGTTG	-940
par1-1	ATCGTGAATCGTTGATCAATCACGAATAAC	-1124
par1-2	TTAATTAAATTGGACTTTGGAATTTGGAATTTTG	-1080
par1-3	GGTGGCCATCTAGGCCGCGGTGAGATAGCAGTGCTCGAT	-4
par1-4	ATAGGCCTGAGTGGCCGACGGACGAGCTTGTGTTGTGTT	+5133
par1-5	TTAATTAAAGATTGGCGGATTTGGTACGATA	+6099
par1-6	TGTCTTGTGAGCGGACGAGGAGGAGTGGA	+6169

plk1-1	CGGGATCCTCGCCGCCAACACCGATGGC	+1269
plk1-3	CATAT GGCCACAGGGCCTTCTTCACTA	+1
plk1-4	AAG GGCCATCTAGGCC AAGACAGTTGTATCAGATAG	-44
plk1-5	AAGAACCAAGTGGACTGAGAACGAAAAG	-769
plk1-6	GGTACC GTGAGGTTTGCACTCTGACAG	-929
plk1-7	TC GGCCTGAGTGGCC CACAAGGCCGCGCATCCTCC	+2919
plk1-8	ACAACGTGTCACGGTGGTCTCGCCAGG	+3627
plk1-9	TTGGTGCAAAGTCGATTCTGCGATTAG	+3767
plk1-10	GAATTC GTGTGGTGGTAGTTGTTGCTGACC	-181
plk1-11b	GGTACC CTCGTAGATCTCGTCGACTTTGGG	+991
plk1-12	ACGCGT CTTGTGTTGCAGCGCCCTCTC	+1732
plk1-13	CATATG CGCCTCCTCCGCCCGCTCCTCGC	+1604
plk1-14	GAATTC ATTGACGGCGTTGGTAGTGGTGGC	+2896
plk1-15	AATCGAAAATGCACGTGATGGACAATCGAG	-1129
plk1-17	GGTACC GAGCGTTACCCTGATCTTGATGTG	-1487
plk1-21	GGTACC TACCCTCACCCTCCCGTCGACAT	-327
plk1-22	CCATGG TGCCATGATAATGGTACAGCTAAC	-1
plk1-27	CGTACG AAGCAATGAGCATGATAAGCAAAGGGC	+3185
plk1-28	GGATCC ATGCCGTCTACCGCGATCGAGGGT	+1142
plk1-32	GGATCC GACCAGGGTCAAGGCCATAGC	+1782
plk1-33	GGTACC AAACTTTATTGCCAAATGTTT	
srk1-1	TCTCTCCTCCCTCTTTCACCCAACGCACCC	-991
srk1-2	CTCGCTTCTTCACCCTCCAGCGTTCCTTGG	-807
srk1-3	GAG GGCCATCTAGGCC TGGTTGGCGTCGGAAGCTGG	-39
srk1-4	CTT GGCCTGAGTGGCC GATTCTTTGTTTCCATCC	+3532
srk1-5	TTGGTGATTAAGAGGGTTTTTCGACATGTCG	+4564
srk1-6	CGAACAAAGGAGCACCGAATCTGTGAATCG	+4742

ANEXO 2

A continuación se muestran los alineamientos de las proteínas estudiadas en este trabajo.

102030405060	
ScBmh1	MST.SREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKTVASSGOELSVEERNLLSVAYKNVIGARRA	59
ScBmh2	MSQ.TREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKAVASSGOELSVEERNLLSVAYKNVIGARRA	59
CaBmh1	MPA.SREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKAVASSGOELSVEERNLLSVAYKNVIGARRA	59
UmBmh1	MPE.SREDSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKRVASSDOELTVEERNLLSVAYKNVIGARRA	59
SpRad25	MSN.SRENSVYLAKLAEQAERYEEMVENMKKVACSNDKLSVEERNLLSVAYKNVIGARRA	59
SpRad24	MSTTSREDVYLAKLAEQAERYEGMVENMKSVASTDOELTVEERNLLSVAYKNVIGARRA	60
708090100110120	
ScBmh1	SWRIVSSIEQKEESKEKSEHVELICSYRSKIETELTKISDDILSVLDSHLIPSATTGES	119
ScBmh2	SWRIVSSIEQKEESKEKSEHVELIRSYRSKIETELTKISDDILSVLDSHLIPSATTGEC	119
CaBmh1	SWRIVSSIEQKEEAKG.NESQVALIRDYRAKIEAELSKICEDILSVLSDHLITSAQTGES	118
UmBmh1	SWRIVSSIEQKEESKG.NETQVSMIKTYREKIEAELAQICEDILDVLDKHLIPSAAAGES	118
SpRad25	SWRISSIEQKEESRG.NTROAALIKYRKIEDELSDICHDLVSVLEKHLIPAAATTGES	118
SpRad24	SWRIVSSIEQKEESKG.NTAQVELIKYRKIEDELDTICODILTVLEKHLIPNAASAES	119
130140150160170180	
ScBmh1	KVFYYKMKGDYHRYLAEFSSGDAREKATNASLEAYKTASEIATTELPPTHPIRLGLALNF	179
ScBmh2	KVFYYKMKGDYHRYLAEFSSGDAREKATNSSLEAYKTASEIATTELPPTHPIRLGLALNF	179
CaBmh1	KVFYYKMKGDYHRYLAEFATAEKRKEAADLSLEAYKAASDVAVTELPPTHPIRLGLALNF	178
UmBmh1	KVFYHKMKGDYHRYLAEFATGDKRKDSADKSLEAYKAASDVAVTELPPTHPIRLGLALNF	178
SpRad25	KVFYYKMKGDYRYLAEFVGVCKEAAADSSLEAYKAASDIAVTELPPTDPRLGLALNF	178
SpRad24	KVFYYKMKGDYRYLAEFVAGKROHSADOSLEGYKAASEIATAELAPTHPIRLGLALNF	179
190200210220230240	
ScBmh1	SVFYFEIIONSPDKACHLRKQAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSMDSE	239
ScBmh2	SVFYFEIIONSPDKACHLAKQAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDISE	239
CaBmh1	SVFYFEILNSPDRACHLAKQAFDDAVADLETLSEISYKDSTLIMQLLRDNLTLWTDLSE	237
UmBmh1	SVFYFEILNSPDRACHLAKQAFDDAIAELDTLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSMDQD	238
SpRad25	SVFYFEILSPESACHLAKQVFDEAISELDSLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDAEY	238
SpRad24	SVFYFEILNSPDRACYLAKQAFDEAISELDSLSEESYKDSTLIMQLLRDNLTLWTSDAEY	239
250260270 . . .	
ScBmh1	SGQAEEDQQQQQHQQQQ.....PPAAAEGEAPK.	267
ScBmh2	SGQEDQQQQQQQQQQQQQQQQQAPAEQTQGEPTK.	273
CaBmh1	APAAATEEQQSSQAP.....AAOPTGKADQE	264
UmBmh1	SEKPTAAAAADA.....PAAEAKGEEAA.	261
SpRad25	NQSAKEEAPAAAAASENEHP..EPKESTTDTVKA.	270
SpRad24	SAAAAGGNTEGAQENAPSN...APEGEAEPKADA.	270

Figura 80. Alineamiento de las proteínas de la familia 14-3-3 de *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* y *C. albicans*. En fono negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los similares.

	. . . 10 . . . 20 . . . 30 . . . 40 . . . 50 . . . 60	
SpChk1MAQKLDNFPYHIG.REIGTGAFASVR..LCYDDNAKTYAVKFNKKHATSCM	49
ScChk1p	...MSLSQVSPLEPHIKDVVLG.DTVGQGAFCVKNHQLQMDPSILAVKFI...HVPTCK	53
AnChk1	...MHHSQALAPLPIDLPFRIVSKTFGQGAYACIKKACPLNADTPVFAVKFIN..KDYAAR	55
XlChk1MAVPFVEDWDLV.OTLGEAGAYGEVQLAVNRKTEAVAVKIVDMTRAADCP.	49
HsChk1MAVPFVEDWDLV.OTLGEAGAYGEVQLAVNRVTEAVAVKIVDMKRAVDCP.	49
UmChk1	MTIPKSSTGQSYPVLDYRIV.QLIGGGGFSKVFRVNPSSESHVVAIKVVISYAPNRSN	59
	. . . 70 . . . 80 . . . 90 . . . 100 . . . 110 . . . 120	
SpChk1	NAGVWARRMASETQLHKLCNGHKNIHFYNTAENFQ.....	85
ScChk1p	KMGLSDKDTITKEVVLQSKCSKHPNVRLIDCNVSKE.....	89
AnChk1	HGKISPROLLMEATVHKHIGDENNIISFFQTGEDGA.....	91
XlChk1ENIKKEICINRMLS.HTNIVRFYGHRRBCN.....	78
HsChk1ENIKKEICINKMLN.HENVVKFYGHRRBCN.....	78
UmChk1	KYPIDRRALOKEVQVHSILK.HPNVLEFLGAVERGVDKNGNAGKEKGILMGEAVATTKES	118
	. . . 130 . . . 140 . . . 150 . . . 160 . . . 170 . . . 180	
SpChk1WRWVLEFAOGGDLFDKIEPDVGTDEDVAQFYFAOLM	122
ScChk1pYMWIILEMADGGDLFDKIP.DVGVSDSDVAQFYFQQLV	125
AnChk1WRWIAMELADGGDLFDKIEADEGCVSEDI GHVYFTOLI	128
XlChk1IQYLFLEYCRGGELFDRIEPDVGMPEQ.AQKFFQOLI	114
HsChk1IQYLFLEYCSGGELFDRIEPDVGMPPEP.AQRFFHOLM	114
UmChk1	IRARDKERQOMLSSPSHDQNYVPGLYMVLELCAGGDLFDKIAPDYCVVEEDLAHFYFQOLL	178
	. . . 190 . . . 200 . . . 210 . . . 220 . . . 230 . . . 240	
SpChk1	EGISFMHSGK.VAHRDIKPENILLDYNGNLKISDFGFASIFSYK.CKSRLLNSPVGSPPY	180
ScChk1p	SAINYLHVECGVAHRDIKPENILLDKNGNLKIDFGLASQFRKDGTLRVSMQDQSGPPY	185
AnChk1	SAVGYMHSKG.VGHRDIKPENILLTADGNLKIADFGLATLFEYK.GGTKLSTTFCSPPY	186
XlChk1	AGVEYLHSIG.ITHRDIKPENILLDERDQLKISDFGLATVFRHN.CKERLLNKMCGTLPY	172
HsChk1	AGVVYLHGIG.ITHRDIKPENILLDERDNLKISDFGLATVFRYN.NR.RLLNKMCGTLPY	171
UmChk1	AGLEYIHSQG.VTHRDIKPENMLLDAEGNLKIADFGLCVYKYK.CKERELTGACGSLPY	236
	. . . 250 . . . 260 . . . 270 . . . 280 . . . 290 . . . 300	
SpChk1	AAPEITQQYD.....G...SKVDVWSCGIIILFALLLGNTPWDEAISNTGDYLLYKQKC	230
ScChk1p	MAPEVLYSEE.....GYVADRTDIWSTIGILLFVLLTGQTPWELPSLENEDFVFFIEND	238
AnChk1	IAPEVITCSSRNQTKGPGYRPDVADIWSCGIVLEVLLAGNTPWDSPTEDSYEFHEVMTN	246
XlChk1	VAPELIKSRA.....FHADPVDVWSCGIVLTAMLAGELPWDQPEVNCQEYCDWKE..	222
HsChk1	VAPELLKRRE.....FHAEFPVDVWSCGIVLTAMLAGELPWDQPSDSCQEYSDWKE..	221
UmChk1	IAPEMN.GKP.....YRGEFPVDVWSSGVVLFAMLVGSTPWDEBPTSRSPESYSAVRTG.	286
	. . . 310 . . . 320 . . . 330 . . . 340 . . . 350 . . . 360	
SpChk1	ERPSYHPWNLSLPGAYSIIITGMLRSDPFKRYSVKHVVQHPWLTSSTPFRTKNGNCADPVA	290
ScChk1p	GNLNWGPWSKIEFTHLNLLRKILQDPDNKRVTLKALKLHPVLEFRASFSGDDGLCNDPEL	298
AnChk1	ARTSDELWQKIPATILSLRGMNLNIDAQARFSTEDVRRHPWETRONKHLAPDGRLRDPIK	306
XlChk1	KNHYLTPWKKISATPLALLCKMLTENPQSRITIPDIKKDRWFTEI.....	267
HsChk1	KKTYLNPWKKIDSAPLALLHKILVENPISARITIPDIKKDRWYNKP.....	266
UmChk1	KLFEYDPPWRIPODALSLKKMMHPTPEKRITFEGIRRHFWFKRANLMTQKKGKCNDPVN	346
	. . . 370 . . . 380 . . . 390 . . . 400 . . . 410 . . . 420	
SpChk1	LASRLMLKLRDLDKP.....RLASS.....RASQNDSGFSMTQPAFKK.	329
ScChk1p	LAKKLFSLKVSLSNEN.....YKFT.....QDINSNNRYISTOPIGNE.	338
AnChk1	VATSMFESLHLDLSQSVSRPLKGGSFPGPDRMDVDIG.....DDLGAEHRISSTOPEVPRG	361
XlChk1	IKKGLKRSRVISGGSSDS...SVLCKQIRSDIDIS...HFSHSEEKTALSSTOPEPRPT.	319
HsChk1	IKKGAKRPRVTSGGVSESP...SGFSKHIQSNLDFSPV.NSASEENVKYSSSOPEPRPT.	321
UmChk1	LAEKLLQGLAVSGDIIVEV...NGAAAAAARLLDLHSDGQRAQVPENVSLTQPDAILTSS	403

		. . . 430 . . . 440 . . . 450 . . . 460 . . . 470 . . . 480	
SpChk1	..NDQKELDRVEVYGALSQP.....VQLNKNIDVTEILEKDP	SLSQFCENEGFIKRLAKK	382
ScChk1p	..LAELEHDSMHFQTVSNTQRAFTSYDSNTNYSNGTGMTQEA	KNTQFISYDIAATQFHSD	396
AnChk1	..DMLIDWDTPHTDVFSSSQPTNNPRPPSSSLTPEILEDEP	SFSQFSQRPSPVMSRTQN	419
XlChk1	..ALATWDSNSSYIDNLVQVK.....GISEFSQPACPDNML	NSQLI	358
HsChk1	..GLSLWDTSPSYIDKLVQK.....ISFSQPTCPDHML	NSQLL	358
UmChk1	FDIAARAVARGWADDTGPGGGLPLPSSTAMPASFASDDMSRRL	AMSCHISSRRAEFSTTAS	463
		. . . 490 . . . 500 . . . 510 . . . 520 . . . 530 . . . 540	
SpChk1	AKNFYEICP.....PERLTRFYSRASRETIIDHL		411
ScChk1p	ENDCNELVKRHLQFN.....PNKLTKFYTLQPMVLLPIL		431
AnChk1	AQRFHDIVP.....SRSLTRFFSTWELKLLVPLI		448
XlChk1	CT.....PGSSQ.....NVWQRLVKRMTRFFTKVNA	SSYSNL	391
HsChk1	CT.....PGSSQ.....NPWQRLVKRMTRFFTKLDA	KSYQCL	391
UmChk1	CSGYDMALPGASQFTQALNHFTQFEALTHVAGTGSSHLRFSP	HLTRFFSSASAATIIALI	523
		. . . 550 . . . 560 . . . 570 . . . 580 . . . 590 . . . 600	
SpChk1	YDSLRLLAISVTMKYVRNQT.....		431
ScChk1p	EKALNLSQIRVKPDLFANFERLCELLGYD.....NVF		463
AnChk1	CEALHRLGVVPAPVAVSPGD.....N		470
XlChk1	MDTCEKMGYVLKKSCAN.....		408
HsChk1	KETCEKLGYSQKKSCMN.....		408
UmChk1	IDVLDRLAVLNAHQAIQDQEELELEEAYNFMADGEPETTVPSDDSSRPTGGSKRL	LIGSR	583
		. . . 610 . . . 620 . . . 630 . . . 640 . . . 650 . . . 660	
SpChk1	..ILYVNLHDKRKCLLOGVLEITNLGHN.....LELINF	IKRNGDPLEWR	474
ScChk1p	PLIINIKTKSNNGYQLCGSTSIKIEEE.....LKS	VGFERKTGDPLEWR	508
AnChk1	SAMIRVITRDCRMCPHKGKVLVECVSEG.....LFE	IEFMKGKGDPLEWR	515
XlChk1	..EVTLSITDRNNKLIFKVNLEMED.....RILL	DFRLSKGDGLEFK	450
HsChk1	..QVTISTTDRNNKLIFKVNLEMD.....KIL	VDFRLSKGDGLEFK	450
UmChk1	GARIRLKTMDRRKCVLRGEVYVENLAAPDSTSDSASAPDRNA	AKCLVVMKKGKGDPLEWR	643
		. . . 670 . . . 680 . . .	
SpChk1	KFFKINVSSIGKPIVLTQVSN..		496
ScChk1p	RLFKKISTICRDIILIPN.....		526
AnChk1	RFFKKVLLCKDAVYTPDS.....		534
XlChk1	RHFLKIKKKMDAVVAVQKV.LPDT		473
HsChk1	RHFLKIKGKLIDIVSSQKVWLPAT		474
UmChk1	RLFREVCRPEIMQTIIST.....		662

Figura 81. Alineamiento de las proteínas de la familia Chk1 de *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, *X. laevis* y *H. sapiens*. En fono negro se indican los aminoácidos idénticos y en fono gris los similares.

102030405060	
SpSrkl	MRFKSIQONIEDEGKVN.....VREVNPD.....YAERDHGYTA	35
AnSrkl	MSTIQSLKNFIRHGKQ.....ARLVTP.....HAEPNTNVSP	32
UmSrkl	MPVLEQFKNFIRHGKATREVPEGIDPSAG...PSIQVHPAESSSSRNQSMASAPTGFVP	57
CaSrkl	..MFENLKAFFIRHGKQAN.....DMK...RKQQQOPQO.....YQQPFSTATANENP	42
ScRck1	...MSVNPEFIADGIDFYPTTPDAAY.FN...AADGKNK.....VNRINGNSENHH	45
ScRck2	..MTKIKALFSKKKPDQADLSQESKPKFKGKTRSSGTNNKD.....VSQITSSPKKSFO	52
708090100110120	
SpSrkl	G.....IFSDAEENFGITQQVADSTQNPISKP.KSRHAHFHETVHENPSE..YSRSK	84
AnSrklVHAEQQRQPOGQ...APAAGNLDADSKLGGGQPHSTQRESP.....	72
UmSrkl	QDKALPGPASTSQTHAAAPTEAFSTATSTTTSKHQTLNSQDQQARDMRQPINGNHLAVP	117
CaSrkl	FQQASNETPDSINVITPNDITINEYQQPDQEPQQYYPQQOQQQQDPYQQETQFOQQQQGVY	102
ScRck1	S.....FASGCRRSSLSVDENVTS.SDSEKSEQSCL.....NNSQE	81
ScRck2	DKNIVQYPSVVADDHMKSLTDELVTITDSDSSPSDNITTENVETVTSVPAID.VHENSE	111
130140150160170180	
SpSrkl	CKOPTNEKEYD...KAIEALVAKAIVVEHSGQ.QFPVYKGL.....EQYTLLQKMGD	132
AnSrklEIPVK...RAREAEIEQITAEKTNRTKMPHYPG...ERYVLLQKMGD	115
UmSrkl	TAGSSKGVAAN...EQYQREARIVAEEREASEKMPYIEGLS.....ERFOLVKKMGD	167
CaSrkl	TNYNQSDVTLNDKNADYNRVASQIVVEENEQRKKSVMKYPNL.....ENYQILDQMG	154
ScRck1	DEYFCDIFSTELKLDETS.....NKSTDYSSSNHQYP.....EQLELHNYKLLNKIGE	129
ScRck2	GQLSSDPLISDESLSQSEIISDITQDSTDDDNMEDEIPEKSFLEQKELIGYKLLNKIGE	171
190200210220230240	
SpSrkl	GAFSNVYKAHNR.....TGKVAIKVVQRAQPNTPDPR..DP.....RRQGV	174
AnSrkl	GAFSNVYRAKDASG.....EYGEVAIKVVRKFEMNSTOS..DAHLHPDFKRPKAAE	165
UmSrkl	GAFSNVYKARDRO.....TGQKVAIKVVRKYELNSNODRDPN...FRKKNRVTE	214
CaSrkl	GAFSVVYKAKHLS.....TGKEVAVKILRKFMDDQAK.....	187
ScRck1	GAFSRVFKAVGIN.....TDDQAPVAIKATIKKGISSD.....AILKGNDRIQGS	175
ScRck2	GAFSKVFRAPAKNSSHEFLTKNYKAVAIKVIKKADLSSING..DHRKKDKGKDSTKTSS	229
250260270280290300	
SpSrkl	SHNILEKVOIMRVRKHNP..ITQLTEFIOTPEYYYIVLELADGGELFHQIVRLTYFSEDL	232
AnSrkl	RANILEKVOIMRQIDHPN..IVKLIQFSESROYIIVLELCPGGELFHQIVRLTYFSEDL	223
UmSrkl	RANILEKVOIMRNLKHEG..IVDLISFSESRDYFIVLELMEGGELFHQIVKLTIFYSEAL	272
CaSrkl	.QAVLKEVTIMRQIDHPN..IVRFITKFIDSPYIIVQELVPGGELFTMIVKYTYFSEDL	244
ScRck1	RKKVLNEVAIHKLVSNNPHCTKFIAFOESANYIIVTELVTGGELFDRIVQLTIFYSEDL	235
ScRck2	RDQALKEVAIHHTVSAGCSQIVAFIDFOETDSYYYIIOELLTGGEIFGEIVRLTYFSEDL	289
310320330340350360	
SpSrkl	SRHVITQVAHAIRYLHEDCGVVHRDIKPENLLFESIDFVPSRVRYRAGDDPD...KVDE	289
AnSrkl	SRHVIVQVAKAIEYLHETSQVVHRDIKPENLLFVPTIYVPSKHPPKPROGDED...KVDE	280
UmSrkl	ARHVILOVAHAIRYLHEERGQVHRDIKPENLLFESIKIIPSKOPVQR.PYDEE...KEDE	328
CaSrkl	SRHVITQIAHAIRYLHEEVGTVHRDIKPENLLVPIDLKPSANPISKLRKSDDPNTKLDE	304
ScRck1	ARHVITQVAIAIKHMHY.MGTVHRDVKPENLLFPIPFYF.....LDGDM..QKDE	284
ScRck2	SRHVIKQIALAVKMHHS.LGVVHRDIKPENLLFPIEFTPSIKPKLRKSDDPQ..TKADE	346
370380390400410420	
SpSrkl	GEFIPGVGAGTIGRIRLADFGLSKVVDSDHTQTPCGTMGYTAPEIVRDERYSKGVDMWAL	349
AnSrkl	GEFIPGKGAGGIGVVIKIADFGLSKVVDWDTQTMTPCGTVGYTAPEIVKDERYSKSDVMWAL	340
UmSrkl	GEFMPGIGGGGIGRVKIADFGLSKVVDWEESTMTPCGTVGYTAPEIVKDERYSKSDVMWAL	388
CaSrkl	GEFVNGVGGGGIGTVKLADFGLSKQIWEHNTKTTCGTVGYTAPEIVRDERYSKGVDMWAL	364
ScRck1	..FTLGVGGGGIGTVKLMDFGLAKKIRNNTAKTPCGTIEYVASEVFTSKRYSMKVDMWSI	342
ScRck2	GIFTTPGVGGGGIGTVKLADFGLSKQIFSKNTKTTCGTVGYTAPEIVKDEHYSMKVDMWGI	406

```

      . . . . 430 . . . . 440 . . . . 450 . . . . 460 . . . . 470 . . . . 480
SpSrkl1 GCVLYTILCGFPPFYDESIISLLTKKVSERGEYSFLSPWDDISKSAKDLISHLLTVDPEER 409
AnSrkl1 GCVLYTLLCGFPPFYDESIQVLTEKVARGQYTFLLSPWDDISKSAKDLISHLLTVDPEER 400
UmSrkl1 GCVLYTLLCGFPPFYDESIISVLTAKVAGYTFLLSPWDDISASAKDLITHLLCVDPERQR 448
CaSrkl1 GCVLYTLLCGFPPFYDERIETLTKVAKGEFTFLKPWWDEISDGAKNVGRLLTVDPEKRR 424
ScRck1  GCVLFTLLCGYPPFYKNEKTLKKISRGDYEFLLAPWWDNISSGAKNAVTHLLEVDENKR 402
ScRck2  GCVLYTMLCGFPPFYDEKIDTLTEKISRGEYTFLLKPWWDEISAGAKNAVSKLLELEPSKR 466

      . . . . 490 . . . . 500 . . . . 510 . . . . 520 . . . . 530 . . . . 540
SpSrkl1 YDIHQFLAHPWISGSREPTFPATDAP...NTAQRENPFYDFLEPE.....DVAAAGSAA 461
AnSrkl1 YTIKQFLAHPWIRQSGETQAASDAPPLTTPAPEARNQALDAIAAELAPYPPASAQLSAG 460
UmSrkl1 YTIDEFLLQHPWCN.VKDPIPDLSAD...IALAKASEMPLDSPLLA.....AMKTGNAA 498
CaSrkl1 YTIDEFLLQDPWMQKTSLSQQPQIPIPV.TNQYPPATKVAHPQIVAN....NRYSKKFRST 479
ScRck1  YDIDDFLNDPWLNSYDCLKDSNSNS.....YASVQSIL.....NDS... 438
ScRck2  YDIDQFLDDPWLNTTFDCLPKEGESSQKKAGTSERRHPHKQFQLFQ.....RDSSLL 518

      . . . . 550 . . . . 560 . . . . 570 . . . . 580 . . . . 590 . . . . 600
SpSrkl1 .....RTPGVNSLREVFNISYAAHRMEQEKIRK...RGQRNGQGINFMGDMDDIMEEN 512
AnSrkl1 ERPMDFRSPGAINLREVFVDVGYAVHRQEEEGKRRKAGRGFRQSNPTAAFQSALNPDEDY 520
UmSrkl1 RN..AMMSPGINRLKEAFDVTYAVHRMEEEGARKR..AGNNNPLGEINNEEDSDEADEAR 554
CaSrkl1 NS..DLYSPAVALRDAFDISTAVHRMGEEAALO...T.KKQAPIEGLEEIEEEHEET 532
ScRck1  .....FDERAETLHCALSCQSEKQDDTEFSRSE.....SSEYTFMTEEDRNLRGSW 484
ScRck2  .....FSPAAMRDAFDIGNAVKR..TEEDRMG.....TRGGLGSLAEDEELEDY 563

      . . . . 610 . . . . 620 . . . . 630 . . . . 640 . . . . 650 . . . . 660
SpSrkl1 DDYD.....DG.....TKSVEHS.....MKRVNLSGENDPSLA..SRQPAQ 546
AnSrkl1 DDEDGAIYQTIDEEGHPPAKMQKSTQQSGDVAAMEAKMRQTNLGATSHAAQMROSHQPRG 580
UmSrkl1 RKYG.....DAAG.....QAVENQRG.....ARIQDNAAATTRTQP..STQQRH 591
CaSrkl1 VTKD.....G.....RVVQDT.....Y....NQVLR..THRRHR 555
ScRck1  IGEP..... 488
ScRck2  SGAQG..... 568

      . . . . 670 . . . . 680 . . . . 690 . . . . 700 . . . . 710 . . . . 720
SpSrkl1 SQQQSSORS.....RNKFKGFOLNLSKATTYN.....RRHRQKV..... 580
AnSrkl1 YGQHSAQVAAAQONMVRNARAPFELSLDNASTLEKRG...RRHCEQPAIPFATLIGNQ 637
UmSrkl1 HQQQQTQOY.....QGRGGADRRLAEAAALYDGRAGPRDRGONSNRKRGFELNMGNA 642
CaSrkl1 HLKNNNNPN.....AFDLNLGGASTIE.....RRKNKQIPIQSS..... 589
ScRck1  .....KECFITDLATSSIYR.....RRKNK.....IFFW.. 512
ScRck2  ....DEOLE.....QNMFQTLTLDTSITLQ.....RRKKVQENDVGPTIPISAT 607

      . . . . 730 . . . . 740 . . . . 750 . . . . 760 . . . .
SpSrkl1 ..... 686
AnSrkl1 TNRPRLLLQAASSRIQVHLLLSVQKQLVLLQSILLNRDNSDVPHSASI 686
UmSrkl1 TLLGRNRKAGGAGTPrLDHNLGNIIVDGAHAAGVVPGSPMRVD..... 684
CaSrkl1 ..... 610
ScRck1 ..... 610
ScRck2 IRE..... 610

```

Figura 82. Alineamiento de las proteínas de la familia MAPKAP tipo Srk1 de *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, y *C. albicans*. En fono negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los similares.

102030405060	
HsPlk1MSAAVTAGKILARAPADPGKAVPGV	25
XlPlx1MAQVAGKKITVAP....EAAKP..	18
UmPlk1	MATGPSSLAHQIPAHPGYARTSTAPTSTLPSRPRPASTIASKQPTTSAAPPATAATATA	60
ScCdc5	MSLGPLKAINDKQLNTRSKLVHTPIKGNTADLVGKENHFKQTKRDPNNDHHHQPAQK..	58
SpPlolMASVAIK.....EPKTAITP.....	15
AnPlkAMERHLQPTMEALSPRSTNQMIKPKASMERKVIDKN.....	35
708090100110120	
HsPlk1	AAPGAPAAAPPAKEIP...EVLVDPRSRR.RYVVRGRFLGKGGFAKCFEISDADTKEVFAG	81
XlPlx1	..PGIPGSSSAVKEIP...EILVDPRTRR.RYLRGRFLGKGGFAKCFEITDLESREVFAG	72
UmPlk1	TTTTSSKSSSKKPTLPPPPKVIIDSEGR..AFKRGDILGQGGFARVYMAVDPEGRRKAFK	118
ScCdc5	..KKREKLSALCKTPP....SLIKTRGKD..YHRGHFLGEGGFARCFQIKD.DSGEITFAA	109
SpPlol	..KKKSASRLCFTTP...TNLHNNKKNIFYTRYDCI GEGGFARCFRVKD.NYGNITFAA	68
AnPlkA	.AAAAQKASSAKNHAPPPPALVVEPGDDGEQYSTCAFLGKGGFATCYEGTLLRNGRVFAM	94
130140150160170180	
HsPlk1	KIVPKSLLLKPFQREKMSMEISIHRSIAHQHVVGFGHGFFEDNDFVVFVLELCRRRSLLLEL	141
XlPlx1	KIVPKTMLLKPFQDKMTMEIATQSLDHRHVVGFGHGFFEDNDFVVFVLELCRRRSLLLEL	132
UmPlk1	VIAKSAIAKSRKRNQKILAEIMIHKSVDHIHVVKFEDCFEDDSNVYFRLELCRNGSLNDV	178
ScCdc5	KTVAKASIKSEKTRKKLLSEIQIHKSMSHPNIVQFIDCFEDDSNVYILLEICPNGLSMEL	169
SpPlol	KVIAKRSIQNDKTKLKLFGKIKVHQSMSHPNIVGFIIDCFEDSTNITLLELCCEHKSLMEL	128
AnPlkA	KVVKSDMGQK.KMQEKFRTELOIHSKMRHPHIVGFHRAFFVYDQCIYVILELCPNGLSVMMD	153
190200210220230240	
HsPlk1	HKRRKALTEPEARYYLRQIVLGCQYLHNRNVIHRDLKLGNI FLNEDLEVKIGDFGLATKV	201
XlPlx1	HKRRKAVTEPEARYYIKQITISGCQYLHSNRNVIHRDLKLGNI FLNDEM EVKIGDFGLATKV	192
UmPlk1	VKRRGPTYTEPEARYLMVOILAGTQNLHONSTIHRDLKLGNI FLDEKMHVKIGDFGLAALL	238
ScCdc5	LKRRKVLTEPEVRFETTOICGAIKYMHSRRVIHRDLKLGNI FFDNSYNLIGDFGLAALL	229
SpPlol	LRKRKQLTEPEVRYLMMOILGALKYMHKKRVIHRDLKLGNI MLDESNNVKIGDFGLAALL	188
AnPlkA	VRKRKCLSLPEVRREVMQLCGAVKYLHKRNVAHRDLKMGNI FLDRNMDIKVGDFGLAAMI	213
250260270280290300	
HsPlk1	EY..DGERKKTICGTPNYIAPEVLSKKG..HSFEVDVWSIGCIMYTL LVGKPPFETSCLK	257
XlPlx1	EY..DGERKKTICGTPNYIAPEVLGKKG..HSFEVDIWSIGCIMYTL LVGKPPFETSCLK	248
UmPlk1	KH..PEERKKTICGTPNYIAPEILYDQGGHHSFEVDIWSVGVIMYTL LVGRPPFQTPKVD	296
ScCdc5	AN..ESERKYTICGTPNYIAPEVLMGKHS GHHSFEVDIWSLGVMLYALLIGKPPFQARDVN	287
SpPlol	MD..DEERKMTICGTPNYIAPEILFNSKEGHSFEVDIWSAGVVMYALLIGKPPFQDKEVK	246
AnPlkA	MSEKDEKRKKTICGTPNYIAPEVLDKSGKHGTOKVVDIWSLGVITCAML TGYPFFQSKTQE	273
310320330340350360	
HsPlk1	ETYLRIKKNEYSTP.....KHINPVAASLIQKMLQTDPTARPTINELLNDEFFTS..GY	309
XlPlx1	ETYMRIKKNEYSTP.....KHINPVAAALIQKMLRSPTSRTTDDLNDEFFTS..GY	300
UmPlk1	EIYERIRONAYETFPQ....AGLSTEAVDLITRLTHNPAQRPTIVQIMNHAWFQC..GP	350
ScCdc5	TIYERIKCRDTSFERD....KPTSDCKILIRDTILSLDPIERPSTTEIMDYVWFR...GT	340
SpPlol	TIYRKIKANSYSFPSN....VDLSAEAKDLISSLLTHDPSIRPSIDDIVDHEFFHT..GY	300
AnPlkA	EIYKKVRNLTIVWPKDSECANHLPDEAKSLVSCCLNLDEQKRPEPDIVIEHAFFNMVNGC	333
370380390400410420	
HsPlk1	IPARLPITCLT.....	320
XlPlx1	IPSRLPTTCLT.....	311
UmPlk1	VPLTIPSTAIEGTFFLPP.....	368
ScCdc5	FPPSIPSTVMSEAPNFED.....	358
SpPlol	MASTLPDEILHSMPIWPS.....	318
AnPlkA	IPKRLDPKCSVQKPTWLRGAEPQGDAMAFGHGLDFDEKFSYIRDVDDPILRYRTCKAAF	393

	. . . 430 . . . 440 . . . 450 . . . 460 . . . 470 . . . 480	
HsPlk1	320
XlPlx1	311
UmPlk1ITARESSARNLEMLKKQARWNRADDLLDDILAANTDGSSPE	409
ScCdc5IPEEQS.....LVN..	367
SpPlo1SQSKSS.....FQR..	327
AnPlkA	YSSCGVGRKPDGTARKSVGHNASKSGFAECLAEEKGLQPLMPLPEDMVYKYPHDLIGDW	453
	. . . 490 . . . 500 . . . 510 . . . 520 . . . 530 . . . 540	
HsPlk1IPPRFSIAPS...LDPSNRK.....PLTVLNKGL...ENPIPE	353
XlPlx1VPPRFSTAPS...IDQSLRK.....PLTAINKGQD...SPTIVE	344
UmPlk1	TYSDARDEPVEVVIDPRTELEQAEQVEERREQLDREFHHAIQPESPISALLKAGROPLIK	469
ScCdc5FKDCMEKSLLESM...SDKIQROK..RD.....YISSIKSSI...KLEEY	407
SpPlo1NLDFVASASGVFGNSAGVEKNK..PY.....ALRTDEVNDRI...PS	367
AnPlkA	SVPESLPLRRQDAIADTSVLSSRS...SSTSLRTNTVSQ....SRTQAALAAAQRRNGSQSH	509
	. . . 550 . . . 560 . . . 570 . . . 580 . . . 590 . . . 600	
HsPlk1	R.....PREK....EEPVVV	364
XlPlx1	KQV.....EEMQOP	358
UmPlk1	APAPPPQSFA.....RSTANSLAKQLSSLTSLRHVGDKENANP...APPPP....APAAP	519
ScCdc5	HQ.....NRPFLPHS...SPGGT....KQKYKE	429
SpPlo1	VLSP.....R....DRVNPVMK...GEETK....PVPSKL	392
AnPlkA	AASLRQQALTGRGTIRKIPSLCDPPQPTMKAMPDVRDAGLNPDVPPVPVTGGLAERPIRT	569
	. . . 610 . . . 620 . . . 630 . . . 640 . . . 650 . . . 660	
HsPlk1	ETG.....	367
XlPlx1	EFT.....	361
UmPlk1	EFGRMYSRNTNVAPAAAQPODERALQHKTRLVASTASGAGGGAPSALSRLPVSLASSINEQ	579
ScCdc5	VVDIEAQRRNLNLAREARIRRAQQAVLRK.....	458
SpPlo1	STALHAARKSTDGSLGSRVKVLRRESQ.....	419
AnPlkA	RRGIAASYSGTTSVRGMDTNAVPSVSQASNDLGMGLTVGKTRSQRKLEAANQVAVEPLRV	629
	. . . 670 . . . 680 . . . 690 . . . 700 . . . 710 . . . 720	
HsPlk1EVVDCHTSDMLQQLHSVNASK	388
XlPlx1EPADCYLSEMLQQLTCLNAV	382
UmPlk1	YNSLARSSSRATLASVGSSTALASGAKKT.....KTSIEVIISH...DSALICLESNSRYT	633
ScCdc5ELI.....ATSTNVIKSETSLRILASECHLTIN	486
SpPlo1SFV.....PTKSAVTEQVEPIQLIRLSLANTVS	447
AnPlkA	LKDRSTSTGPENLAASVRQKSARTVHKDLGGVAARKPDSEAAARREEFPVTRQRTAQPPM	689
	. . . 730 . . . 740 . . . 750 . . . 760 . . . 770 . . . 780	
HsPlk1PSERGLVRQEEAEDPACIP.....	407
XlPlx1PSERALIRQEEAEDPASIP.....	401
UmPlk1PPSSAMDAVRFVETSCELN.....	653
ScCdc5G.....IVEAEAQYKMGGLPKSRLPKI.....	508
SpPlo1	RLSKVGNMKSIDIWISVKKTALKIGMALEAHTHAL.....	481
AnPlkA	SSSGSKASLSSTNKPRSSLGLHALLHSDDPCELLPGSSIDDVKIDLRNMLSNLVPGSAAR	749
	. . . 790 . . . 800 . . . 810 . . . 820 . . . 830 . . . 840	
HsPlk1IFWVSKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDDSTR.....	441
XlPlx1IFWISKWVDYSDKYGLGYQLCDNSVGVLFNDDSTR.....	435
UmPlk1	GTCLTPESPRTFLISWLDHSEYGLGYALSDGTGVVYFRDATS.....	696
ScCdc5	KHP.....MITKWDYSNKIGFSYQLSTEDIGVLFNNGTT.....	544
SpPlo1	TSEDADSEPVLFITKWDYSNKYGLGYQLSDSESVGVHFNDDTS.....	524
AnPlkA	RRVVSQRPPHAYVLIKWVDYINRYGTGYVLDDGSVGCVFKAENGQPASGVVLRDGEKHRR	809

	850	860	870	880	890	900	
HsPlk1	LILYNDGDSLOYIE	455
XlPlx1	LIMYNDGDSLOYIE	449
UmPlk1	MVLSASKKHVDYISTIRASKVATPGAVKTDQLKRENFVMAC	737
ScCdc5	VLRLADAEFWYISYD	D..R.....	562
SpPlol	LLFSADDEEVVEYALHP	K..D.....	542
AnPlkA	KARSQENS	DSQSWSYSEADQLVPRHGKPV	EYENCSDDLLLECRGGICRALIPPSLFEVKD	869
	910	920	930	940	950	960	
HsPlk1	RDGTESYLTVSSHPNSLMKKITLLKYFRNYMSEHLLKAG..ANITPREGDELARL	508
XlPlx1	RNNTESYLNVRSYPTTLTKKITLLKYFRNYMSEHLLKAG..ANTTPREGDELARL	502
UmPlk1	APATSSTACPAI	ADDGSPRELHRSRVVMKYFEKETMDRLYGAD..SPLTFTDAERTSGM	795
ScCdc5	EGWVASHYLLSEKPRELSRHLEVVDFFAKYMKANLSRVS...TFGREYHKDD..	612
SpPlol	TEIKPYIYPASKVPESIRSKIQLLKHFKSYMGNLSKAVQDESEFKPKNSTNTM	597
AnPlkA	SSGGVKVRMDS	GISRARADAEKIKRVKLVDOFGKYMIGSLGRHG.DETLLDDAATDGAPG	928
	970	980	990	1000	1010	1020	
HsPlk1	PYLRTWFRTRSAILLHLSNGSVQINFFQDHTKLIILCPLMAAVTYID	554
XlPlx1	PFLRTWFRTRSAILLHLSNGTVQINFFQDHTKIILCPLMAAVSYID	548
UmPlk1	TFVHKWYKTKDAIVFRLSNGTVQINFFQDHTKLIILCPLMAAVSYID	854
ScCdc5	VFLRRYTRYKPFVVFELSDGTFQFNFK.DHHKMATSDGGKLVTYIS	657
SpPlol	LFMQHYLRTRQAIMFRLSNGIFQFNFL.DHRKVVISSTARKIIVLD	642
AnPlkA	QFIKFKYQRLGNVGVWGFQDGAFFQFNFP.DHTKLVLPAGRTRNSSPWMDFYHLSPTAARYL	987
	1030	1040	1050	1060	1070	1080	
HsPlk1	EKRDFRTYRLSLLEEYGCCKETAS..RLRYARTMVD	588
XlPlx1	EKREFRTYRLSLIQEFGCCKETAS..RLRYARTMVE	582
UmPlk1	TLAEFVSIARSDRSAREAQAQAVEDDRGEPTTLRKIRPAERRKVRGLVT..KLRYAVEVLH	912
ScCdc5	PSHESTYPLVEVLKYGEIPGPES.NFREKLTLIK	692
SpPlol	KERERVELPLQEASAFSED.....LRSRLKYIR	670
AnPlkA	AAKG...KMHPSGFDTRAVVSDEIATFLSIAVGTSTSAMDDKIREFVLDANSFLQKIAFIK	1044
	1090	1100	1110	1120	1130	1140	
HsPlk1	KLSSRSASNRKAS	603
XlPlx1	KLQSSKSAVAHAKASA	598
UmPlk1	TTVQSKRTGLVRSDSATTNAVN	935
ScCdc5	EGTKQKSTIVTD	705
SpPlol	ETLESWASKMEVS	683
AnPlkA	DVLKSWIRQGRGGRPSSDKPGTEMFWEQSQERPQASGGGSSKFVWVTVGAPGGDGEYRS	1104
	1150	1160	
HsPlk1	
XlPlx1	
UmPlk1	
ScCdc5	
SpPlol	
AnPlkA	VSLRDKKGN	SVGENDEMEALRERLRLAGL	1133	

Figura 83. Alineamiento de las proteínas de la familia poloquinasa de *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *A. nidulans*, y *X. laevis* y *H. sapiens*. En fono negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los similares

. . . .102030405060	
ScKcc4
ScGin4
SpCdr1
ScHsl1MTGHVSKTSHVPKGRPSSLAKKAARAMAKV 31
CaHsl1MSTVVNRRSSHQFDSPS 17
SpCdr2
UmHsl1	MSSSQRPVVQPIPPFKGAPLQATDVQNRPTAAEAYVALANRKAGANVVSTRATGCENHR 60
. . . .708090100110120	
ScKcc4MTVANTETHSAAKPSS.....TIGPWKLG 24
ScGin4MAINGNSIPAIDN.....TIGPWKLG 22
SpCdr1MVKRHKN.....TIGPWRLG 15
ScHsl1	NSNPKRASGHLERVVQSVNDATKRLSQPDSTVSATKSSKRKSRD.....TVGPWKLG 84
CaHsl1	NHLDHSSSMNVKVVQSVTNATKR..LSQISTNTNNSNKKRKTON.....KIGPWKLG 68
SpCdr2MSTIS.....EVGPWELG 13
UmHsl1	PSQHQPSTSHHASQRRQPAPAADRRVQQSQPSERPKPASRLREKKRHHNDPKNIGHWRID 120
. . . .130140150160170180	
ScKcc4	ETLGFSGTGKVLQAQHERTGHRITAVKVISKSIFNN...NGN..... 62
ScGin4	ETLGLGSTGKVLQARNGSTGQEAQVVISKAVFNTGNVSGTSIV..... 66
SpCdr1	KTLGTGSTSCVRLAKHAKTGDLAAIKIPIRYASIG..... 51
ScHsl1	KTLGKGSSGRVRLAKNMETGQLAAIKIVPKKAFVHCSNNGTVPNSYSSSMVTSNVSSPS 144
CaHsl1	RTLGRGSTGRVRLAKNTTTGQLAAVKIVPKSNFKLENPKYKR..... 111
SpCdr2	LSLGSGGPNSSRLAKHRETGQLAVVKEIVGWSELTS..... 49
UmHsl1	KLIGQASGRVRLAHDQTGQAAVKIIPRTLINASRMSLR..... 161
. . . .190200210220230240	
ScKcc4HSNDDSVLPYNIEREIVIMKLLSHPNVLSLYDVWETNNLYLILEYAEKGELFNL 117
ScGin4GSTTPDALPYGIEREIVIMKLLNHPNVLRLYDVWETNTDLYLVLEYAEKGELFNL 121
SpCdr1MEILMMRLLRHPNILLRLYDVWTDHQQHYLALEYVPDGELEFHY 93
ScHsl1	IASREHSNHSQTNPYGIEREIVIMKLISHTNVMALFEVWENKSELYLVLEYVDGGELEFDY 204
CaHsl1SKEDATRLPYGIEREIVIMKLISHPNIMGLYDVWENKNDLYLILEYIEGGELEFDY 166
SpCdr2SQQAR.....IEGELVLLRLIEHPNVLQITDVISAQEQLFVVVEYMPGGELEFDC 98
UmHsl1DADV KANKMILGIEREIVIMKLLIEHPNILLGLWDVYETSKDLFLIMEYVAGGELEFDH 217
. . . .250260270280290300	
ScKcc4	LVDHGGLPEREAINCFROIIGISYCHALGIVHRDLKPENLLLSFYNIKIADFGMAAL 176
ScGin4	LVERGGLPEHEAIRFFROIIGISYCHALGIVHRDLKPENLLLDHKYNIKIADFGMAAL 180
SpCdr1	LRKBGPLSEREAAHYLSOILDAVAHCHFRFRHRDLKLENILIKVNEQIKIADFGMATV 153
ScHsl1	LVSCKGLPEREAIHYFKQIVEGVSYCHSFNICHRLDKPENLLLDKKNRRIKIADFGMAAL 264
CaHsl1	LIRKRGKLOEYEAINYFKQIINGINYLHQFNICHRLDKPENLLLDNFKNIKIADFGMAAL 225
SpCdr2	MRKGSFTQDTAKELWQILCGEYCHKLHICHRLDKPENLYLDAHGSIKIGFGMASI 157
UmHsl1	LVAQGLSPRDARGYFRQIIFGM DYCHRFNICHRLDKPENLLLDDETKKIVKVADFGMAAL 277
. . . .310320330340350360	
ScKcc4	QTDADLLETSCGSPHYAAPEIVSCLPYEGFASDVWSCGVILFALLTGRLPFDEENGIVRD 236
ScGin4	ETEGKLLLETSCGSPHYAAPEIVSCIPYQGFASDVWSCGVILFALLTGRLPFDEEDGNIRT 240
SpCdr1	EPNDSCLENYCGSLHYLAPEIVSHKPYRGAPADVWSCGVILYSLLSNKLPFGGQ..NTDV 211
ScHsl1	ELPNKLLKTSCGSPHYASPEIVMGRPYHGGPSDVWSCGIVLFALLTGHLPFND..NIKK 322
CaHsl1	EVKEKLLLETSCGSPHYASPEIVAGKNYHGAPSDIWSCGIILFALLTGHLPFDD..NIRK 283
SpCdr2	QQPGKLLTSCGSPHYASPEIVMGRSYDGCASDIWSCGIILFALLTGKLPFDDD..NIRS 215
UmHsl1	QPTKMLLETSCGSPHYASPEIVSGKRYKGTASDIWSCGIILFALLTGRLPFDDP..NIQQ 335

	370	380	390	400	410	420	
ScKcc4	LLLKVQKGFEMPNDTEISRDAODLIGKILVVDPRQRIRKTRDILSHPLLKKYQTIKDSKS	296					
ScGin4	LLLKVQKGFEMPSSDDEISREAODLIRKILTVDPERRIKTRDILKHPLLQKYPISIRDSKS	300					
SpCdr1	IYNKIRHGAYDLPSS..ISSAODLHRMLDVNPSTRITIPVFSHPFLMGCTSLSSMDS	269					
ScHsl1	LLLKVQSGKYQMPSN..LSSEARDLISKILVIDPEKRITTOEILKHPLLKKYDDLVPNVK	380					
CaHsl1	LLLKVQSGKFNPPE..LSFEAKDLITKMLKVNPERRITIDAILTHPLLAKYPEPTVSYS	341					
SpCdr2	LLLKVQCGQFEMPNS..ISPOAOHLIRMLDVDSSTRITIMEQIREHPFLSCFVHPNISIP	273					
UmHsl1	LLGKVRACKFIMPEW..LEPAASKDLIWRMLEVDPEKRIKMAIDMRHPWFTNNGTESSVNP	393					
	430	440	450	460	470	480	
ScKcc4	IKDLPRENTYL.....YPLADSNNHTSASIDDSILQNLVVLWHGRH.ADDIVS	343					
ScGin4	IRGLPREDTYL.....TPLSESN..S..SIDATILQNLVILWHGRD.PEGIKE	343					
SpCdr1	TTPP.....TPSLSID.....EIDPLVVDCMCVLWKKSS.SKKVVR	304					
ScHsl1	LRKMRKDNMARGKSNSDLHLLNNVSPSIVTLHSGKEIDESILRSLOILWHGVS.RELITA	439					
CaHsl1	STTTLDIN.....S.INIKQIESVDKIDKEILKNLSVLFNCD.EKTIIS	384					
SpCdr2	TISAP.....IQPIDPLIVQHLSLVFRCSDDPMPPIYE	305					
UmHsl1	VSTS.....LDSLQMEELTLDTIDIDILGNLKTLLWFELS.EQDTIK	433					
	490	500	510	520	530	540	
ScKcc4	KLKENGNTNKEKILYALLYRFKLDLSDVSGSNKKNRNKIKKTKKNKRSS...TLSSSSS...	396					
ScGin4	KLREPGANAEEKTYALLYRFKCDTQKELIKQQQVKKRQSISSVSVSPSKKVSTTPQ....	399					
SpCdr1	RLQQRDDNDEKYVYKVLSEILRDDMLKKQRFDENKYSLYDLIHDN.....	350					
ScHsl1	KLLQKPMSEEEKLFYSLLLQYKQRHSISLSSSENKKSATESSVNEPRIEYASKTANNTGL	499					
CaHsl1	RLLSPNRCPEKMFYLLMKYRNEHLSNSNSFNSSNDVDSARSLPRSTSYVKTTVTDHATG	444					
SpCdr2	KLASQSPLVEKTYTLLSRHLHPPSSAAVDRNRNAVDDLLGTAASN.....G.....	352					
UmHsl1	ELLAPGPSWOKTFYTLVAHRENHSADDEDDMNDILDEQIVTASAVP.....	481					
	550	560	570	580	590	600	
ScKcc4	396					
ScGin4	399					
SpCdr1	350					
ScHsl1	RSENNDVKTLSLEIHS EDTSTVNQNNAITGVNTEINAPVLAQKSQFSINTLSQPESDKA	559					
CaHsl1	EKHTTVKKIQQSSSIYSNRSLKSTSAKGNVLSN.....ITNRPNTPKQFSASSS	495					
SpCdr2	352					
UmHsl1	481					
	610	620	630	640	650	660	
ScKcc4LLNNSRQSTPRRRTSKRHSREFSSSRKRSSFLLSSNPTD.....	437					
ScGin4RRNRRESISVTSSRKKPISFNKF TASASSSNLTTPGSSKRLSKNFSSKKKLST	454					
SpCdr1N.LFTKASISTTSLVKS	366					
ScHsl1	EAEAVTLPPAIPIFNASSSRIFRNSYTSISSRRLRLSLNSRLSLSASTSRETVDNEM	619					
CaHsl1	FNKKKALHSKTOIYASRSRNASSRSLKSNSTGRNGNNASVTSVNKIPEITGATVLQPI	555					
SpCdr2QQMDEEEIEQAINIPTLAPYPISYAAESVPRPATAS	389					
UmHsl1	...AHALLSTTSAAKTLEKPRPRRTSDAAGATSA PASPRLES	520					
	670	680	690	700	710	720	
ScKcc4SSPIPLRSSKR	448					
ScGin4	IVNQSSPTPASRNKR	469					
SpCdr1N	367					
ScHsl1	PLPQLPKSPSRYSLSRAI	638					
CaHsl1	SMAMNRGDEQQNKTKKNLTGTFGNKSLNLFQICEEVFENDKENS KPVSKTPVSQLPPPP	615					
SpCdr2	389					
UmHsl1	520					

	. . . 730 . . . 740 . . . 750 . . . 760 . . . 770 . . . 780	
ScKcc4ITHINVASANTQATPSGVPNPHKRNSSKRRSSKRLSYMPNTRKSSLTSKSLSNFTNL	504
ScGin4ASVINVEKNQKRASIFSTTKKNKRSS..RSIKRMSLIPSMKRESVTTKLMSTYAKL	523
SpCdr1VSTNSRKSSNFEDELARRVSS.....P.LSALNQVQSQSPIPIRVSS.....	407
ScHsl1	.HASPSTKSLHKSLSRKNIAATVAARRTLQNSASKRSLYSLSQSLSKRSLNLNDLLVFDDP	697
CaHsl1	PPPIETPTSRNTSVKRGKTSLARRERELAEQVRQREARENKAKAEELARKELEQEKRR	675
SpCdr2PFLTPVTTSGTFNYSFNATNPQSILQR..PATSSAVPQLPKSVTPGLAYP.....	438
UmHsl1VEMDRRHSTPEKGSVYHTTSRRPDNVTTPKVASPHVRPANPSPLRPSPDPSAST	576
	. . . 790 . . . 800 . . . 810 . . . 820 . . . 830 . . . 840	
ScKcc4	I.....DDDDWEYIEKDAKRTSSNFATLIDEIFEPEKFELAKREKAELQKVKQEAQR...	556
ScGin4	A.....EDDDWEYIEKETKRTSSNFATLIDEIFEYEKYEQIRKEKEELERKVVREAKAREE	578
SpCdr1D.KDYDSYACHEVVSNPSTLDDDDYN.....	431
ScHsl1	LPSKKPASENVNKSEPHSLESDFSFEILCDQILFGNALDRILEEEDNEKERDTRQQRQN	757
CaHsl1	IAEEKKRLFEQGERELDEKQKLEKQKAALFKLQKHQSAHDFEGLFASNRRSVTDMAPSSG	735
SpCdr2HDSSMLSSNYRPPSALSPRNFN.....	460
UmHsl1	LDSAFVSASKLVASPTKPRALGSSHGADKSGYVLPQISLQTASPORNERPAVDLQRRN.	635
	. . . 850 . . . 860 . . . 870 . . . 880 . . . 890 . . . 900	
ScKcc4QSVNAQKINEDE.....FGSEVSDGMKELKKINDK...	586
ScGin4	LERRRRKQEEKERARKLLEKEDLKRKQEEELK.....KQIEIDISDLEQELSKHKEEKLD	632
SpCdr1YMF.....	434
ScHsl1	DTKSSADTFTISGVSTNKENEGPEYPTKIEK.....NQFNMSYKP.SENMSGSSFPPIF	810
CaHsl1	MSSLDPRAHMSVRANTIGSPNLSSSSVNIDENASKVLHKFGIDVAPSPKRFSRASKTSTS	795
SpCdr2	460
UmHsl1TSPTKPNTVGVGTAPLSARIALAN.....MYDAPTLSHTATASCGSTS	677
	. . . 910 . . . 920 . . . 930 . . . 940 . . . 950 . . . 960	
ScKcc4VSSPLINYEFSQOELLQDIDTLLTNRYQL.....SS	617
ScGin4	GNIRISAPMENEEKNINHLEVDDNILR.RRNF.....SL	667
SpCdr1VCPPEEYTYSTDNVRTDLSLDLQS.....L	458
ScHsl1	EKENTLSSSYLEEQKPKRAALSDTNSFNKMKNQEGMR....IEKKIQREQLQKKNDRPS	866
CaHsl1	KNLSSFLAPTYSRNLSSQLKTSSSKNLAGYLHGTDTNGSAIAAKKDDSTNEALTIEEF	855
SpCdr2VSINDPEVQLSRRATSLDMSNDFR.....	484
UmHsl1	STASSTVSVSAARNRANRGSGSEMMPPLALPGRASS.....RP.....VS	717
	. . . 970 . . . 980 . . . 990 . . . 1000 . . . 1010 . . . 1020	
ScKcc4	YTRPISRLDPGTT...PVTETLPNNLKEKTALLQDTEKKIETTR.....	659
ScGin4	QTRPVSRLDPGTFMFSSPTEEVSPEVKRTENERLRTTEKKIETTR.....	712
SpCdr1	PTPTLEQLES.....	468
ScHsl1	PLKPIQHQLRYNSLPNDQGKPSLSLDPRRNISQPVNSKVESLQGLKFKKEPASHWTHE	926
CaHsl1	NAKERTSMSPSSKASVNKRNSNQSSYYRSMFSDNGNDDNVTKVRTG.ESHLSVQEEEM	914
SpCdr2	..MNENDP.....S.....	491
UmHsl1	PTKSTFGAQTTPPQTAPQPAPPRPSTSRAYTTQPTPCIQVPOVG.....DA	764
	. . . 1030 . . . 1040 . . . 1050 . . . 1060 . . . 1070 . . . 1080	
ScKcc4	.RSKFLGSLNLNVRGGLSPGKSE....LAP..IEESP...IVSTTPLIYNDRMEP.....	703
ScGin4	.RSKFLGSSFNIDKELKLSKMEYPSIIAPQRLSEER...VVSDSNDGYESLILPKDGNV	768
SpCdr1VP..FNRYGYVRIFPST.....	483
ScHsl1	RGSLFMSEHVEDEKPVKASDVSIESSYVPLTTVATS...SRDPSVLAESSTIQKPLSLP	983
CaHsl1	DMENAIDEDISLIPNPRFSRFSFGLLGSNTVANEEGDWTIMNSTLNHSNTTVVRGTHNKS	974
SpCdr2IVGNLAASNFPPTGMGPPR.....	509
UmHsl1	TMQRFFQEIADELASIRATGEKPDALQSKLDQLKNMAWQQQQQQQLQSQPMVATASAP	824

	. . .1090 . . .1100 . . .1110 . . .1120 . . .1130 . . .1140	
ScKcc4RRISDVEVPHFTRKSKHFTTANNRRSVLSLY.....	734
ScGin4	SQLKDSTATTAPVSDGRLRKISEIRVPQFTRKSRHFSESNKRLSVLSMYS.....	818
SpCdr1TLSTASGYTPDSLSTPE.....P.....	503
ScHsl1	SSFLN.....TSMTFKNLSQILADDGDDKHLVSPQNQSRVAMSHPLRKQSAKISLT	1035
CaHsl1	STMLG.....LGIKMRDTTIKEDEEFDEKPFISVPSEDEDEGNTHKNKRGGLRDS	1026
SpCdr2KRVTSRMSEHTGNRVVSFPRGSAFN.....	534
UmHsl1	SARTR.....NSEMNQFEDAEDDVSEGESMRSVVSQASSHQQTYPSTPMT.....	870
	. . .1150 . . .1160 . . .1170 . . .1180 . . .1190 . . .1200	
ScKcc4AKDSIKDINEFLIKEDPDLPPQ	756
ScGin4TKESFTNIVDILKNGNLVNNQ	840
SpCdr1SIDGLTNLDDVQVGG.....	518
ScHsl1	PRSNLNANLSVKRNQGPSYLSNDLDGISDMTFAMEIPTNTFTAQAIQLMNNDTNNKI	1095
CaHsl1	GNYDFDEEHSVASTANTEYSVASQGQOMP..SHTIHQLETELSNFDLLSYRVADIGKV	1084
SpCdr2PRVTRFNVGNEQFSNNIDNNNY	556
UmHsl1LSPVELIAPTALTDKSGAGARSSV	894
	. . .1210 . . .1220 . . .1230 . . .1240 . . .1250 . . .1260	
ScKcc4	GSTDNES.RSEDPEIAESITDSRNIQYDEDDSKD.....GDNVNNDN..ILSDFPQGVG	807
ScGin4	QSQRIPTRPSADDSEFLFETVNEEAETGNSSNDERLYDVG DSTIKDKSALKLNFADRFN	900
SpCdr1FVQSGNQ.....	526
ScHsl1	NTSPKASSFTKEKVIKSAAYISKEKEPDNSDTNYPDYTIPNTYDEKAINIFEDAPSDEG	1155
CaHsl1	NKHKPSIVDSKETLLKNHSSDEATIEVKEDNNEHDFNDKIKQHYDDNGDSEDEDEDEE	1144
SpCdr2	NQPYANATMNNRRRLRTPSGE.....RSMRADLSQS.....	587
UmHsl1	ASSSASASARNSVRSARSGTEASSSGTTSRPTSVFSNISTGSTGLGRKRSLLGLRRADKH	954
	. . .1270 . . .1280 . . .1290 . . .1300 . . .1310 . . .1320	
ScKcc4	ISQEYDMKD.....KNPNQSPIS.....	825
ScGin4	GSNEAKQTDN.....LHLPILPPLNGDNELRKQN	929
SpCdr1NRRPIS.....	532
ScHsl1	SLNTSSSESDSRASVHRKAVSIDTMATTNVLT PATNVRVSLYWNNSSGIPRETTEEILS	1215
CaHsl1	EEDDDDDDDARSSFEARPHSHN.....YSLAETSESPPVGGGYESP SIA	1188
SpCdr2PASYSNLN.....	595
UmHsl1	AQQQHATATEANTIR.....SIAYESTPTPTALASVFAAPASG	992
	. . .1330 . . .1340 . . .1350 . . .1360 . . .1370 . . .1380	
ScKcc4KSAEPTLVVKLP..SLSSFQGKNASGLGLYQREPSKVTLPSLTNNSSVGENIEDG	879
ScGin4	SQEGDQAHPKIKSMIPESGSSSHTEKEEENEKEEKKPEQHKQEEDQEKREKVDDMEPP	989
SpCdr1FPVISNMQP.....N.....ITNVRASAPL	553
ScHsl1	KLRLSPENPSNTHMQKRFSSIRGSRDSNALGISQSLQSMFKDLEEDQDGHTSQADIESS	1275
CaHsl1	NDFKKS RHSTGIFSTTQFPRSPYVNNNGDSN KDENSQOQTKHMLNDGHKGLITSPVQDT	1248
SpCdr2VPKHRRRQSLFSPSTKKKLSGSPFPKRSFLRRLFSSEPSCCKVYASLVASE	648
UmHsl1	RFVPNGGATTASSVRMQRNLNPGGLDIGASSAAGIISPSTPQSPNTATLSPAPAASASA	1052
	. . .1390 . . .1400 . . .1410 . . .1420 . . .1430 . . .1440	
ScKcc4	AEKGTE..SEKIA.....ASLSDDDLKEDNDKKDNDTVNAPT	915
ScGin4	LNKSVQKIREKNA.....GSQAKDHSKDHLKEHKQDKNTAIG.	1026
SpCdr1	CSSPVP.....	559
ScHsl1	MSYSKRPPSEESVNPQRVTMLFDEEEEEESKVGKGKIKEHTKLDNKISEESSQLVLPV	1335
CaHsl1	FGSKKP..VESNSLFR.....RLSLNPNRAAPKAPAPPPPSAPIS	1286
SpCdr2	LEHEILEVLRR.....	659
UmHsl1	IASASAPGKKDSWFAG.....LFNWKPATFTLMSENFSETLTEC	1092

	. . .1450 . . .1460 . . .1470 . . .1480 . . .1490 . . .1500	
ScKcc4	VKKPPNSV.....	923
ScGin4NGS.....	1029
SpCdr1	559
ScHsl1	VEKKENANNTENNYSKIPKPSTIKVTKDTAMESNTQHTTKKPILKSVQNVVEVEEAPSSDK	1395
CaHsl1	SAAKANISQPLSSPTKG.....HNRFSRISIGSKNMLQKEDKSTK	1326
SpCdr2	659
UmHsl1	IRRLQSYG.....	1100
	. . .1510 . . .1520 . . .1530 . . .1540 . . .1550 . . .1560	
ScKcc4LLKKFSKGIKILELE..IHAKIPEKRLYEGLHKLLEGWKQYGLKNLVFNITNMII	975
ScGin4FFRKFSKSSDKTME..LYAKISAKQLFNGLKLLRGWTQYGLKNIKSHPNNTL	1081
SpCdr1S.....R.....RYSQYATN..ARYTP....	574
ScHsl1	KNWFVKLFQNFSSHNNATKA..SKNHVTNISFDDAHMLTLNEFNKNSIDYQLKNLDHKFG	1453
CaHsl1	SNWFKKFFHSLTTPSAKDQSGNSSSKVASKDIKIIDTSLTAAQLIRVIKYQLELKKIEGS	1386
SpCdr2WQLLGIGIADIITYDSVSASISARIKQNSLNLKPVRFRISVLAEFFGSQAVF	711
UmHsl1VRVAMDDSSDVHHTTLKCSINNEYRESNGVVTAAKPLRFRVDVHILAVGSPATN	1153
	. . .1570 . . .1580 . . .1590 . . .1600 . . .1610 . . .1620	
ScKcc4	TGKIIVNDSILFLRSTLFEIMVLPNGDGRSLIKFNKKT.....GSTK	1016
ScGin4	TGKISSDNIFSLRSTLFEVNIYPRGK.MSVVQFKKVS.....GSFK	1121
SpCdr1	R.KVSSGSVLRKISSFFRKD.....	593
ScHsl1	RKVVEYDCKFVKGNFKFKIKITSTPNASSVITVKKRSKHS.....NTSSNK	1499
CaHsl1	ISKVDIDEFGLISGVIPSKFANGRKLKFKIEVIDLINSSSLHVIK.....MKGNDK	1438
SpCdr2	VLESGSSTTFDLHATEFQLIFEDKGFLDNLELSYFQAS.....ASRPV	754
UmHsl1	SAYMGGGLGLSLHGGAVGTNVNATSIMTHGLPSPALSTYSRASTPGGVTFATSVLVVQEK	1213
	. . .1630 . . .1640 . . .	
ScKcc4	TLTKLATEIQIITQKEGVLDK.....	1037
ScGin4	AVKKLVNEVENVLNKEGVLOK.....	1142
SpCdr1	
ScHsl1	AFEKFNDDEVETRNAGRS.....	1518
CaHsl1	GFQSLVNIIVTFITKKEEQDKISRR..	1462
SpCdr2	SRMSVSSSPFAVFRQSVQS.....	775
UmHsl1	GALSTFKLTHARTRREWMLDLGSAII	1239

Figura 84. Alineamiento de las proteínas de la familia Nim1/Cdr1 de *U. maydis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, y *C. albicans*. En fono negro se indican los aminoácidos idénticos y en fondo gris los similares

